

**IN - VITRO - BAKTERIZIDIEEFFEKTE
SIMULIRTER SERUM - UND
KANTHARIDINBLASENFLÜSSIGKEITSSPIEGELPROFILE
BEI STAPHYLOCOCCUS AUREUS - UND
STREPTOCOCCUS PYOGENES - HAUTISOLATEN**

WILHELM MAIER

1987



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554616_0059

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik
der Universität München

Dir.: Prof. Dr. med. Dr. h. c. O. Braun-Falco

IN - VITRO - BAKTERIZIDIEFFEKTE SIMULIRTER
SERUM - UND KANTHARIDINBLASENFLÜSSIGKEITSSPIEGEL -
PROFILE BEI STAPHYLOCOCCUS AUREUS - UND
STREPTOCOCCUS PYOGENES - HAUTISOLATEN

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von

Wilhelm Maier

aus

Gmund am Tegernsee

München 1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. H.C. Korting

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. O. Braun-Falco
Prof. Dr. G. Ruckdeschel

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 28.04.87

1.	Einleitung	1
1.1.	Einleitung	1
1.1.1.	Einleitung	1
1.1.2.	Einleitung	1
1.2.	Einleitung	1
1.2.1.	Einleitung	1
1.2.2.	Einleitung	1
1.3.	Einleitung	1
1.3.1.	Einleitung	1
1.3.2.	Einleitung	1
1.3.3.	Einleitung	1
1.3.4.	Einleitung	1
1.3.5.	Einleitung	1
1.3.6.	Einleitung	1
1.3.7.	Einleitung	1
1.3.8.	Einleitung	1
1.3.9.	Einleitung	1
1.3.10.	Einleitung	1
1.3.11.	Einleitung	1
1.3.12.	Einleitung	1
1.3.13.	Einleitung	1
1.3.14.	Einleitung	1
1.3.15.	Einleitung	1
1.3.16.	Einleitung	1
1.3.17.	Einleitung	1
1.3.18.	Einleitung	1
1.3.19.	Einleitung	1
1.3.20.	Einleitung	1
1.3.21.	Einleitung	1
1.3.22.	Einleitung	1
1.3.23.	Einleitung	1
1.3.24.	Einleitung	1
1.3.25.	Einleitung	1
1.3.26.	Einleitung	1
1.3.27.	Einleitung	1
1.3.28.	Einleitung	1
1.3.29.	Einleitung	1
1.3.30.	Einleitung	1
1.3.31.	Einleitung	1
1.3.32.	Einleitung	1
1.3.33.	Einleitung	1
1.3.34.	Einleitung	1
1.3.35.	Einleitung	1
1.3.36.	Einleitung	1
1.3.37.	Einleitung	1
1.3.38.	Einleitung	1
1.3.39.	Einleitung	1
1.3.40.	Einleitung	1
1.3.41.	Einleitung	1
1.3.42.	Einleitung	1
1.3.43.	Einleitung	1
1.3.44.	Einleitung	1
1.3.45.	Einleitung	1
1.3.46.	Einleitung	1
1.3.47.	Einleitung	1
1.3.48.	Einleitung	1
1.3.49.	Einleitung	1
1.3.50.	Einleitung	1
1.3.51.	Einleitung	1
1.3.52.	Einleitung	1
1.3.53.	Einleitung	1
1.3.54.	Einleitung	1
1.3.55.	Einleitung	1
1.3.56.	Einleitung	1
1.3.57.	Einleitung	1
1.3.58.	Einleitung	1
1.3.59.	Einleitung	1
1.3.60.	Einleitung	1
1.3.61.	Einleitung	1
1.3.62.	Einleitung	1
1.3.63.	Einleitung	1
1.3.64.	Einleitung	1
1.3.65.	Einleitung	1
1.3.66.	Einleitung	1
1.3.67.	Einleitung	1
1.3.68.	Einleitung	1
1.3.69.	Einleitung	1
1.3.70.	Einleitung	1
1.3.71.	Einleitung	1
1.3.72.	Einleitung	1
1.3.73.	Einleitung	1
1.3.74.	Einleitung	1
1.3.75.	Einleitung	1
1.3.76.	Einleitung	1
1.3.77.	Einleitung	1
1.3.78.	Einleitung	1
1.3.79.	Einleitung	1
1.3.80.	Einleitung	1
1.3.81.	Einleitung	1
1.3.82.	Einleitung	1
1.3.83.	Einleitung	1
1.3.84.	Einleitung	1
1.3.85.	Einleitung	1
1.3.86.	Einleitung	1
1.3.87.	Einleitung	1
1.3.88.	Einleitung	1
1.3.89.	Einleitung	1
1.3.90.	Einleitung	1
1.3.91.	Einleitung	1
1.3.92.	Einleitung	1
1.3.93.	Einleitung	1
1.3.94.	Einleitung	1
1.3.95.	Einleitung	1
1.3.96.	Einleitung	1
1.3.97.	Einleitung	1
1.3.98.	Einleitung	1
1.3.99.	Einleitung	1
1.3.100.	Einleitung	1

in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
1.1.	Staphylococcus aureus und Streptococcus pyogenes - die Problematik zweier klassischer Erreger von Hauterkrankungen	1
1.1.1.	Resistenzsituation	1
1.1.2.	Allergienentwicklung	4
1.2.	Quinolone oder Gyrasehemmer - eine neue Gruppe antibakterieller Chemotherapeutika	6
1.2.1.	Chemische Struktur der Gyrasehemmer	7
1.2.2.	Wirkungsweise der Gyrasehemmer	9
1.3.	Notwendigkeit einer verbesserten In-vitro- Simulation	14
2.	Material und Methoden	16
2.1.	Klassifizierung des Untersuchungsmaterials . . .	16
2.1.1.	Staphylococcus aureus (S.aureus)- Klassifikation	16
2.1.2.	Streptococcus pyogenes (S.pyogenes)- Klassifikation	18
2.2.	MHK-Bestimmung von Penicillin G und Ofloxacin gegenüber den oben genannten Bakterienstämmen	21
2.2.1.	MHK-Werte gegenüber S.aureus-Hautisolaten . . .	22
2.2.2.	MHK-Werte gegenüber S.pyogenes-Hautisolaten . .	23
2.3.	Chemotherapeutika	24
2.4.	Kulturmedien	25
2.5.	Simulation der Ofloxacinspiegel im Blut und im Gewebe	26
2.5.1.	Spiegelprofil in Serumflüssigkeit	26
2.5.2.	Spiegelprofil in Kantharidinblasenflüssigkeit .	29
2.6.	Modellapparat und Untersuchungsgang	32

2.6.1.	Entwicklung kinetischer Modelle	32
2.6.2.	Mathematische Grundlagen	33
2.6.3.	Berechnung der Volumina	36
2.6.4.	Berechnung der Modellversuchsdosis	38
2.6.5	Versuchsvorbereitung	42
2.6.6.	Versuchsaufbau	44
2.6.7.	Versuchsdurchführung	46
2.7.	Keimzahlbestimmung	48
2.8.	Chemotherapeutikumspiegelbestimmung für die gesamte Versuchsreihe	50
3.	Ergebnisse	54
3.1.	Wachstum der eingesetzten Bakterienstämme im Flüssigmedium	54
3.1.1.	Wachstum der Staphylococcus aureus-Hautisolate .	54
3.1.2.	Wachstum der Streptococcus pyogenes-Hautisolate	55
3.2.	Wachstumshemmung bei Staphylococcus aureus . . .	56
3.2.1.	Entwicklung der S.aureus-Bakteriendichte in Gegenwart des simulierten Serumspiegelprofils von Ofloxacin	57
3.2.2.	Entwicklung der S.aureus-Bakteriendichte in Ge- genwart des simulierten Kantharidinblasen- flüssigkeits(CBF)-Spiegelprofils von Ofloxacin .	59
3.2.3.	Bakterizidieparameter der In-vitro-Simulation bei S.aureus	62
3.3.	Wachstumshemmung bei Streptococcus pyogenes . .	64
3.3.1.	Entwicklung der S.pyogenes-Bakteriendichte in Gegenwart der simulierten Serumspiegelprofils von Ofloxacin	64
3.3.2.	Entwicklung der S.pyogenes-Bakteriendichte in Ge- genwart des simulierten Kantharidinblasen- flüssigkeits(CBF)-Spiegelprofils von Ofloxacin .	67
3.3.3.	Bakterizidieparameter der In-vitro-Simulation bei S.pyogenes	70

4.	Diskussion	73
4.1.	Verbesserte Aussagekraft über die klinische Wirksamkeit von Ofloxacin durch den dynamischen Versuchsansatz	73
4.2.	Unterschiedliche Wirksamkeit der simulierten Konzentrationsprofile auf die untersuchten Hautisolate	76
4.3.	Verbreiterung der klinischen Prüfung von Ofloxacin gegenüber Staphylo- und Streptokokkeninfektionen	79
5.	Zusammenfassung	82
5.1.	Erkenntnisse der S.aureus-Testung	83
5.2.	Erkenntnisse der S.pyogenes-Testung	84
	Verzeichnis der Abbildungen	86
	Verzeichnis der Tabellen	90
6.	Literaturverzeichnis	91
7.	Danksagung	104
8.	Lebenslauf	105

1. Einleitung

1.1. Staphylococcus aureus und Streptococcus pyogenes- die Problematik zweier klassischer Erreger von Hauterkrankun- gen

Die Pyodermien, d. h. die durch *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pyogenes* hervorgerufenen eitrigen Hauterkrankungen wie Impetigo, Folliculitis, Furunkel usw. stellen auch heute einen wesentlichen Teil des dermatologischen Krankengutes dar, so daß einer erfolgreichen Therapie, in Anbetracht der noch aufzuzeigenden Problematik, ein fundamentales Interesse entgegengebracht werden muß.

1.1.1. Resistenzsituation

Es ist zweifelsfrei, daß die Schwere und die Bedrohlichkeit der bakteriellen Infektionen mit dem Einsatz der Chemotherapeutika geringer geworden sind. Es kann aber nicht in Frage gestellt werden, daß die steigende Chemotherapeutikaresistenz der Erreger neue Probleme aufwirft, was die ungünstige Entwicklung der Morbiditätsquote der bakteriellen Infektionen während des vergangenen Jahrzehnts beweist; außerdem müssen wir heute beim dermatologischen Krankengut in etwa 10 Prozent der Fälle mit primären Infektionen oder Superinfektionen bestehender Erkrankungsherde rechnen (89).

Übereinstimmend läßt sich in allen Fachbereichen der Medizin feststellen, daß die staphylogenen Infektionen zahlenmäßig nach wie vor die wichtigste Rolle spielen. So muß in der Dermatologie die Häufigkeit der Staphylokokken-Infektionen und Superinfektionen mit 60 bis 70 Prozent angenommen werden, während die Zahl der streptogenen Infektionen bei etwa 10 bis 15 Prozent liegt. Es ist daher von therapeutischem Interesse, die Resistenzentwicklung bei *Staphylococcus aureus* während

der letzten Jahrzehnte zu verfolgen (2, 6, 11, 18, 26, 27, 48, 49, 51, 52, 57, 62, 75, 76, 93, 94, 115, 117, 118, 125, 128), der durch seine enzymatische Ausstattung in besonderem Maße zur Resistenzbildung befähigt wird. Dies gilt nicht zuletzt auch für die S.aureus-Hautinfektionen (4, 70, 83, 84, 90, 121).

Denn obwohl sich diese Resistenz auch durch Anwesenheit subinhibitorischer Antibiotikakonzentrationen allmählich entwickeln kann, im Sinne einer Selektion von fortschreitend unempfindlicheren Mutanten der mikrobiellen Population, so scheint doch ebenso eine durch extrachromosomale Gene hervorgerufene plötzliche Resistenz in besonderem Maße für S.aureus eine Rolle zu spielen, wobei der Bakterienstamm in einem Schritt aus der Sensibilität in die Resistenz überwechselt. Diese extrachromosomalen Gene scheinen als ringförmig geschlossene DNA in der Zelle zu liegen; sie sind als "Plasmide" bekannt (67).

Plasmide können von der Zelle erworben werden und auch wieder verloren gehen. Bei S.aureus ist das Auftauchen solcher Plasmide an "bakterienpathogene" Viren, sogenannte Phagen gebunden. Phagen besitzen eine sehr komplexe Struktur. Obgleich es sogar bei den für eine Bakterienart spezifischen Phagen Unterschiede gibt, ist doch der generelle Aufbau aller Phagen aus Kopf und Schwanz der gleiche. Der Kopf beinhaltet die Phagen-DNA, mit dem Schwanz lagert sich der Phage an die Zellwand an, Phagenenzyme verändern diese, und schließlich kann die Phagen-DNA durch eine "Kontraktion" des Schwanzes in die Zelle eingebracht werden. Die in das Bakterienchromosom eingebaute Phagen-DNA wird Prophage genannt, ist unauffällig und wird wie das Bakterienchromosom bei der Zellteilung weitergegeben.

Verschiedene stimulierende Einflüsse, z. B. UV-Bestrahlung, veranlassen jedoch die Zelle, auf einmal den gesamten Stoffwechsel auf die Produktion vollständiger Phagen umzustellen.

Der Prophage organisiert diesen Prozeß, in dessen Verlauf auch Teile der chromosomalen oder der Plasmid-DNA dem Phagengenom hinzugefügt werden können. Die Zelle geht schließlich zugrunde, Massen neuer Phagen werden freigesetzt und lagern sich ihrerseits an Gastgeberbakterien an. Es folgt nun entweder wieder die Umorganisation mit Bakterienlyse oder, wie bei den meisten *S.aureus*-Stämmen, die beschriebene "Lyso-genie" mit Einbau des Phagengenoms in das Bakterienchromosom. Dadurch können Eigenschaften der Ursprungszelle, z. B. die Resistenz gegenüber bestimmten Chemotherapeutika, übertragen werden, ein Prozeß, der als Transduktion (74) bekannt ist.

Unter optimalen Wachstumsbedingungen vervielfältigen sich die Plasmide selbständig, aber bei schlechteren Bedingungen kann die Plasmidvermehrung mit der Zellteilung nicht Schritt halten, so daß einigen Tochterzellen die Plasmide fehlen können, d. h. eine vorhandene Resistenz kann wieder verloren gehen (3). Der Besitz und die Replikation der Plasmid-DNA scheint also die Zelle zu belasten und stellt, außer in Gegenwart selektiver Einflüsse meist einen Nachteil dar. Der Bau dieser Plasmide ist noch nicht endgültig erforscht, aber sie könnten Teile chromosomaler DNA darstellen, die selbständig geworden sind und keine für die Zelle wichtige genetische Information tragen.

Dabei stellt sich die derzeitige Resistenzsituation (89) wie folgt dar: Penicillin G und das halbsynthetische Ampicillin sollten wegen der hohen Resistenzquoten von ca. 70 Prozent bei der Auswahl eines Antibiotikums zur Behandlung generell nicht mehr berücksichtigt werden. Auch das penicillinasefeste Oxacillin scheint nicht immer wirksam zu sein (70). Auch gegenüber den bislang allgemein üblichen Breitbandantibiotika ist, wenn auch nicht so deutlich, ein Ansteigen der resistenten Stämme zu verzeichnen (4, 13, 80, 93, 120). Es imponiert hierbei Tetracyclin mit Resistenzquoten von ca. 35 Prozent, über Chloramphenicol (ca. 18 Prozent), Erythromycin

(ca. 12 Prozent) und Gentamycin (ca. 8 Prozent).

In der Gruppe der Oberflächenantibiotika zeigen sich die weitaus niedrigsten Resistenzquoten. Neomycin (15 Prozent), Bacitracin (12 Prozent) und Nebacetin (3 Prozent) wurden getestet, die Indikation für ihren therapeutischen Einsatz ist jedoch durch die häufige Auslösung von Kontaktallergien deutlich eingeengt. Von daher erscheint nicht zuletzt auch unter dem Blickwinkel der Dermatologie die Suche nach neuen *S.aureus*-wirksamen Chemotherapeutika stets geboten.

Bei Infektionen mit *Streptococcus pyogenes* der Gruppe A nach Lancefield kann dagegen heute Penicillin G, bzw. Phenoxymethylpenicillin, von wenigen Ausnahmen abgesehen (73), immer noch als das Mittel der Wahl gelten, nicht zuletzt auch im dermatologischen Bereich (29, 32, 33, 35, 92).

1.1.2. Allergienentwicklung

Eine zusätzliche Einengung des therapeutischen Einsatzes bringt die Sensibilisierung des menschlichen Organismus durch viele Substanzen, wie z. B. Arzneimittel. Nach wie vor stellt dies die wichtigste Komplikation einer Penicillintherapie (0,5 bis 2 Prozent) dar. Als Allergene wirken neben dem intakten Penicillin-Molekül auch antibakteriell inaktive Umwandlungsprodukte der 6-Amino-Penicillansäure, z. B. die Penicilloylsäure. Da alle Penicilline von der 6-Amino-Penicillansäure abstammen, besteht deshalb zwischen den verschiedenen Präparaten meist eine Kreuzallergie.

Zwischen den Penicillinen und Cephalosporinen kommt eine Kreuzallergie sehr selten vor, so daß bei Penicillinallergie manchmal noch eine Behandlung mit Cephalosporinen möglich bleibt (111).

Das Auftreten einer Penicillin-Allergie hängt von verschiedenen Faktoren ab, z. B.

- a) von der Art des Penicillins: nach Anwendung von Ampicillin sind Hautreaktionen häufiger als nach Penicillin G oder V;
- b) vom Funktionszustand des lymphoretikulozytären Systems: Patienten mit infektiöser Mononukleose erkranken fast immer an einer Ampicillin-Allergie;
- c) von der Applikationsweise des Penicillins: besonders die lokale Anwendung von Penicillin auf der Haut oder Schleimhaut begünstigt die Entstehung von Penicillinallergie (11).

Als therapeutische Alternative schlechthin konnten hier lange Zeit die Tetrazykline gelten, die aufgrund einer zunehmenden Resistenzsteigerung in den letzten Jahrzehnten aber nicht in allen Fällen wirksam sind (14, 57, 73, 96). Und obwohl auch Erythromycin sich anbietet (19, 55, 73), erscheint es wünschenswert, ebenso für Streptococcus pyogenes-Infektionen weitere therapeutische Alternativen aufzuzeigen.

Absolut vermeidbar durch den Therapeuten ist weder die Resistenzentwicklung der Keime, noch die Sensibilisierung des Patienten, beides aber kann durch überlegte und gezielte Maßnahmen eingeschränkt werden.

So ist zu erwähnen, daß beim Versagen eines anfangs wirksamen Chemotherapeutikums sich unter Behandlung ein Erregerwechsel vollzogen haben kann, entweder durch resistent gewordene Keime der gleichen Art oder durch das Hinzukommen neuer Spezies. Die Wiederholung einer Erreger- und Resistenzbestimmung während der Therapie ist in diesen Fällen erforderlich. Da viele Ubiquitärkeime mit fakultativ pathogenem Charakter, wie Staphylococcus aureus und Streptococcus pyogenes, zum einen nicht getrennt vom Infektionsgeschehen bekämpft werden können und zum anderen bei dem Wirt keine Immunitäten hinter-

lassen, ist die Möglichkeit sich wiederholender Infektionen durchaus gegeben. In ihrem Verlauf können sich auch bei gleicher Keimart infolge einer vielgestaltigen Symptomatik sehr verschiedenartige klinische Bilder ausprägen, wodurch der wiederholte Einsatz von Chemotherapeutika bereits programmiert ist und Veranlassung gibt, auf die alte, aber immer wieder erhobene Forderung hinzuweisen, daß sich der Einsatz von Chemotherapeutika an den Erreger- und Resistenztestergebnissen orientieren sollte, um Therapieversager weitgehend zu vermeiden, und daß die Suche nach neuen, therapeutisch hoch wirksamen Alternativen nicht vernachlässigt werden darf.

1.2. Quinolone oder Gyrasehemmer - eine neue Gruppe antibakterieller Chemotherapeutika

Nicht nur die Suche nach neuen Substanzen, sondern auch die geduldige Weiterentwicklung eines gering geschätzten Präparates, bzw. einer Wirkstoff-Gruppe, kann zu überraschenden und hochinteressanten Derivaten führen.

Nach der Einführung der mit vielen Nachteilen behafteten, pharmakokinetisch ungünstigen Nalidixinsäure im Jahre 1962, dauerte es viele Jahre, bis weitere Substanzen aus der Gruppe der Quinolone bekannt wurden.

In den letzten Jahren ist es nun zur Entwicklung einer großen Anzahl von neuen, wesentlich aktiveren, fluorierten Derivaten dieser Gruppe gekommen. Das Interessante an dieser Gruppe ist die Tatsache, daß es sich hier nicht um eine weitere Variation innerhalb eines lange bekannten Prinzips handelt, denn die Chemotherapeutika der Nalidixinsäure-Gruppe haben keine nahe Verwandtschaft zu anderen Chemotherapeutika (Abb. 1).

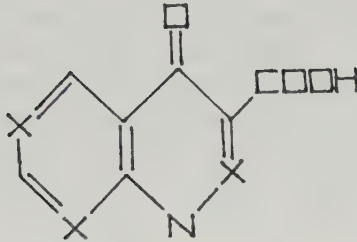


Abb. 1: Schematische Grundstruktur der Gyrasehemmer (x = Positionen, die noch weitere Stickstoffatome enthalten können.)

Die Paul-Ehrlich-Gesellschaft hat deshalb im Dezember 1983 für diese Chemotherapeutikagruppe der Quinolone den Begriff "Gyrasehemmer" vorgeschlagen, um damit gleichzeitig auf den Wirkungsmechanismus hinzuweisen. Zum Baukasten der Cephalosporine und Penicilline ist nun der neue Baukasten der Gyrasehemmer hinzugekommen (20).

1.2.1. Chemische Struktur der Gyrasehemmer

Die Erkenntnis, Parasiten gewissermaßen durch >>Anfärben<< zu schädigen oder gar abzutöten, führte zunächst über Methylenblau und Chinin nach vielen Zwischenprodukten Anfang der sechziger Jahre zu einer hochwirksamen Verbindung, die unter dem Namen Nalidixinsäure bekannt wurde (Abb. 2). Mit diesem Erfolg war das Startsignal für eine interessante Entwicklung gegeben, die inzwischen zu einer ganzen Palette strukturell verwandter Präparate geführt hat. Das Austauschprinzip -N= gegen -CH= lieferte die Präparate Cinoxacin, Piromidin- und Pipemidinsäure (Abb.3).

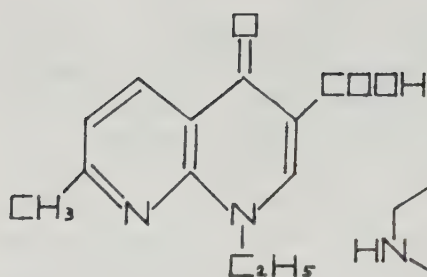


Abb. 2: Strukturformel von Nalidixinsäure

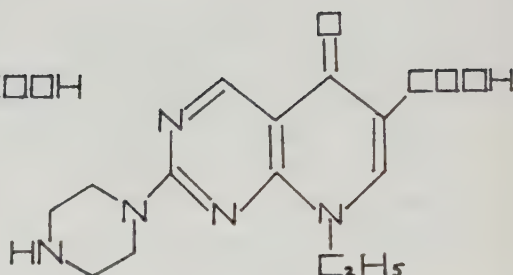


Abb. 3: Strukturformel von Pipemidinsäure

Bei den beiden letzteren wurden zwei $-\text{CH}_2=\text{Gruppen}$ durch N-Moleküle ersetzt, nämlich die in 8- und 6-Stellung, des weiteren wurde an die 7-Stellung ein basischer Rest gebunden. Diese Variation brachte eine Erweiterung des ursprünglich nur gegen gramnegative Keime gerichteten Aktivitätsspektrums mit sich, in dem nun mehr auch grampositive Keime erfaßt wurden. Bedeutsame Fortschritte wurden auch in der Chinolinreihe selbst erzielt, also in dem ursprünglich heterozyklischen System. Die Substitution der 6- und 7-Stellung durch die Methylendioxy-Gruppe lieferte die Oxolinsäure, während im Flumequine (Abb. 4) ein neues Variationsprinzip sichtbar wird, nämlich die Blockierung der 6-Stellung durch ein Fluoratom und des weiteren die Bindung der 1-Ethylgruppe durch einen Bügel aus zwei Methylengruppen an die 8-Stellung des Chinolinringes.

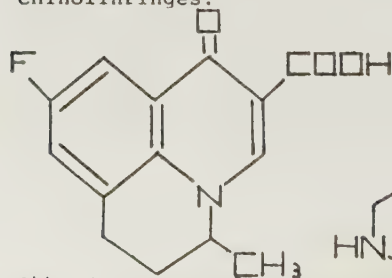


Abb. 4: Strukturformel von Flumequine

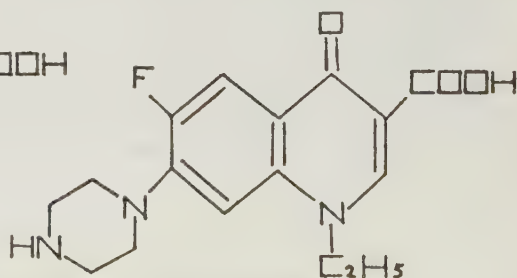


Abb. 5: Strukturformel von Norfloxacin

Eine sehr bedeutsam gewordene Gruppe von Präparaten dieser Körperklasse ergab sich durch eine Kombination der 6-Fluor-Substitution mit einem Piperazinring in 7-Stellung. Wichtigstes Beispiel dafür ist Norfloxacin (Abb. 5), aus dem schließlich durch Übernahme des "Bügelprinzips" für die Alkylsubstitution in 1-Stellung, das in den folgenden Versuchsreihen verwendete Ofloxacin (Strukturformel siehe 2.3) entwickelt wurde (71).

Bei diesem Präparat ist die 6,7,8-Trisubstitution bemerkenswert, die sich bei Studien der Struktur-Wirkungs-Beziehungen in dieser Reihe als besonders wirksam herausgestellt hatte. Ofloxacin zeichnet sich durch sehr gute Resorption und geringe Metabolisierung aus.

1.2.2. Wirkungsweise der Gyrasehemmer

Wie schon erwähnt, hemmt diese Substanzklasse die DNS-Gyrase der Bakterienzelle, da jedoch nur in Ausnahmefällen bekannt ist, was sich unter der Bezeichnung DNS-Gyrase verbirgt, bzw. welche Funktionen Gyrasehemmern haben, seien die molekulargenetischen Vorgänge in der Bakterienzelle an dieser Stelle kurz dargestellt.

Die DNS (Desoxyribonucleinsäure) enthält die Information für ihre eigene Verdopplung und die Ausprägung von Strukturen und Funktionen einer lebenden Zelle. Sie ist der Träger der genetischen Information. Chemisch stellt sie ein Polynukleotid dar, bestehend aus der 2-Desoxyribose, Phosphorsäure und den Basen Cytosin, Thymin, Guanin und Adenin. Die Phosphorsäure bildet zwischen dem 3'-C-Atom der Desoxyribose und dem 5'-C-Atom der benachbarten Desoxyribose Phosphodiesterbrücken, woraus beim Aneinanderreihen einer großen Zahl solcher Moleküle eine lange, unverzweigte Polynukleotidkette resultiert. An das 1'-C-Atom ist eine der Basen Cytosin, Thymin, Guanin

oder Adenin gebunden, in deren Aufeinanderfolge innerhalb der Polynukleotidkette die genetische Information verschlüsselt ist.

Eine DNS setzt sich aus zwei Polynukleotidsträngen zusammen. Dies ergibt eine Struktur, die derjenigen einer Leiter gleicht. Die äußeren Begrenzungen der Leiter werden durch die Desoxyribose und die Phosphorsäure dargestellt, die Sprossen entsprechen den Basen. Diese Basen sind über Wasserstoffbrückenverbindungen "gepaart". Dabei verbindet sich ein Adenin nur mit einem Thymin und ein Guanin nur mit einem Cytosin. Diese Leiter ist um ihre Achse im Sinne einer Rechtsschraube gewunden und bildet so die bekannte Doppelhelix. Die Enden der Doppelhelix können miteinander verbunden sein, wobei eine Ringstruktur (Beispiel: Plasmide, Bakterienchromosom) entsteht. Ihre Struktur läßt sich anschaulich durch zwei umeinandergewickelte Drähte darstellen.

Die DNS-Ringstruktur wird als "Open circular"-Form eines Plasmids bezeichnet. Diese Form eignet sich zwar sehr gut zur Demonstration des Aufbaus der DNS, findet sich aber so gut wie nicht in der Zelle. Vielmehr muß diese Struktur "Supertwist" besitzen, damit aus sterischen und energetischen Gründen in der Zelle die darauf befindliche genetische Information von den Enzymen erkannt werden kann. Diesen Supertwist katalysieren Enzyme, sogenannte Topoisomerasen, die Energie (ATP) für ihre Leistung benötigen. Topoisomerasen ändern nichts an dem chemischen Aufbau der DNS, sie drehen die DNS lediglich um ihre Achse, wobei als Nebenprodukt ein DNS-Knäuel mit Supertwist entsteht.

Diese Achsendrehung erfolgt im Sinne einer linkshändigen Schraube (negativer Supertwist). Es ist leicht verständlich, daß diese "verknäuelte" DNS ein energiereiches Molekül darstellt, das die Tendenz hat, wieder eine Ringstruktur zu entwickeln.

Eine der für die Bakterienzelle wichtigen Topoisomerasen ist

die DNS-Gyrase. Die DNS-Gyrase besteht aus zwei Untereinheiten, A und B; beide zusammen werden für die Funktion der DNS-Gyrase benötigt. Die Untereinheit A wird durch Nalidixinsäure gehemmt und arbeitet ATP-unabhängig, die Untereinheit B wird durch Novobiocin gehemmt und benötigt ATP. Um sich die Wirkungsweise der DNS-Gyrase klarzumachen, gehe man davon aus, daß ein DNS-Molekül in der offenen Ringform vorliegt. Die Gyrase bindet an die DNS, so daß sich die DNS in positiver Achesendrehung um das Enzym legt (28, 38). Die Untereinheit A der Gyrase schneidet jetzt die DNS-Doppelhelix an einer Stelle beidsträngig durch (38). Anschließend "fädelt" die Untereinheit B die beiden Enden des geschnittenen Stranges hinter den sie unterkreuzenden DNS-Strang. Diese katalytische Funktion der B-Untereinheit erfordert Energie in Form von ATP. Jetzt tritt die A-Untereinheit wieder in Aktion und verknüpft beide Enden des zuvor geschnittenen Stranges (28, 38). Die Untereinheit A hat also zwei Aufgaben, nämlich, den DNS-Strang sowohl zu schneiden als auch, ihn wieder zu verknüpfen. Bei dem beschriebenen Vorgang schneidet die DNS-Gyrase die DNS-Stränge nun in der Weise, daß selektiv nur die positive Achsendrehung beseitigt wird, die negative Achsendrehung aber erhalten bleibt. Wird dieser Vorgang oftmals wiederholt, so entsteht durch die Wirkung der DNS-Gyrase eine linkshändig gedrehte DNS-Struktur mit negativem Supertwist (Abb. 6).



Abb.6: Schematische Darstellung einer Plasmid-DNS mit linkshändigem (negativem) Supertwist, nach Ausbildung einiger Windungen durch DNS-Gyrase

Sehr interessant ist in diesem Zusammenhang die Frage, wodurch in der Bakterienzelle die vorhandene Gesamtmenge an DNS-Gyrase reguliert wird. Es ist bekannt, daß in der Zelle ein Gleichgewicht besteht zwischen der für das Supercoiling verantwortlichen Gyrase und den Enzymen, die das Supercoiling wieder aufheben können, vor allem also der DNS-Topoisomerase I. Fisher (39) konnte zeigen, daß die DNS-Gyrase sich vermutlich selbst reguliert, wobei sie sich daran orientiert, wieviel DNS in der Zelle "supercoiled" Struktur besitzt. Die bakterielle DNS-Gyrase benötigt für ihre enzymatische Wirkung Adenosintriphosphat (ATP). Die Funktionsweise zwischen Gyrase und ATP ist in Abb. 7 schematisch dargestellt.

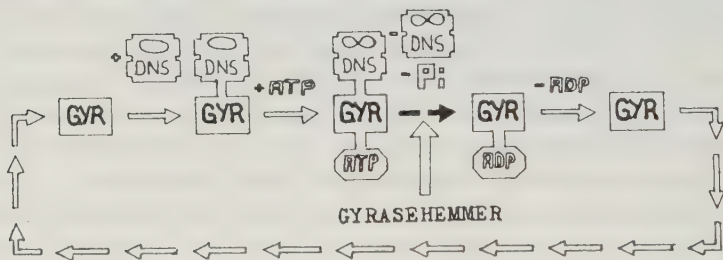


Abb. 7: Die Rolle des ATP bei der Gyrasewirkung (Gyr = DNS-Gyrase), Erläuterungen siehe Text

In einem ersten Schritt wickelt sich die Gyrase (= Gyr) um die DNS; hierfür wird kein ATP benötigt. Anschließend wird in einer zweiten Reaktion ATP gebunden, so daß ein Komplex aus Gyrase-DNS-ATP resultiert. Gleichzeitig wird durch die Gyrasewirkung die DNS "supercoiled". Dieser Schritt der ATP-Bindung kann ebenfalls behindert werden.

In der Folge muß sich der Komplex Gyrase-DNS-ATP wieder auflösen. Dabei wird zuerst die "supercoiled" DNS und das Orthophosphat (P_i) abgespalten. Dieser Schritt kann durch Gyrasehemmer wie Ofloxacin unterbunden werden. In diesem Fall

ist der Gyrase-DNS-ATP-Komplex nicht in der Lage, sich aufzulösen, und die Gyrase wird gewissermaßen "gefangen"; sie ist damit für weitere Reaktionen verloren.

Nach Abspaltung der DNS und des P_i resultiert ein Gyrase-ADP-Komplex, der sich durch Abspaltung von ADP ebenfalls auflöst. Es verbleibt die wieder funktionsbereite DNS-Gyrase, die erneut den geschilderten Kreislauf durchlaufen kann.

Die Vorgänge der Verdopplung der DNS (Replikation), der Transkription (der Ablesung und Übertragung der Information von der DNS auf die m-RNS), die Rekombination (dem Austausch genetischen Materials verschiedener DNSs) und der Reparatur von DNS-Schäden (38), sind von einer DNS-Konformation mit negativem Supertwist abhängig. Die dabei wirksamen Enzyme können weder die Information einer rechtsgedrehten verknäulten DNS ausnutzen, noch ist ihnen die genetische Information der DNS zugänglich, wenn sie in "unverknäueltem" Zustand vorliegt. Die erwähnten Vorgänge sind von zentraler Bedeutung für die Bakterienzelle, d.h., wenn sie ausfallen, hat die Zelle keine Überlebenschance. Gyrase ist folglich eine vitale Komponente der Bakterienzelle.

Die Gyrasewirkung ist ATP-abhängig; die B-Untereinheit benötigt ATP als Energiequelle. Diese Tatsache ist jedoch nicht von klinischer Bedeutung. Wie erwähnt, kann die B-Untereinheit aber auch durch Novobiocin blockiert werden. In diesem Fall wird die A-Untereinheit die DNS nach wie vor schneiden. Es kommt also zum Doppelstrangbruch, da die B-Untereinheit aber blockiert ist, kann die DNS nicht "verdrillt" werden. Eine bereits teilweise verdrillte DNS wird sich deshalb wieder spontan entspiralisieren. Wird die A-Untereinheit gehemmt, so fällt die DNS-Gyrase ebenfalls aus. In diesem Fall kann der Doppelstrang nicht weiter gedreht werden, da die DNS nicht mehr geschnitten wird; dies ist jedoch Voraussetzung für den Spiralisationsvorgang. Damit verhindern Gyrasehemmer, daß sich eine bestimmte energiereiche räumliche

Struktur (Konformation) der DNS ausbildet, die für das Funktionieren vitaler Vorgänge in der Zelle Voraussetzung ist. Die Konsequenz ist für die Zelle letal. Deshalb sind die Gyrasehemmer als "bakterizid" wirkende Chemotherapeutika einzustufen.

1.3. Notwendigkeit einer verbesserten In-vitro-Simulation

Den neu entwickelten Quinolonen oder Gyrasehemmern kommt in dem unter 1.1. erwähnten Zusammenhang derzeit besonderes Interesse zu, da sie sich, anders als die früheren Vertreter dieser Substanzklasse (7, 10, 58), in vitro, gemessen an der statischen Größe der minimalen Hemmkonzentration (MHK), als recht wirksame gegenüber *Staphylococcus aureus* (21, 24, 31, 103) und *Streptococcus pyogenes* (21, 43, 105, 127) erwiesen haben.

Für Ofloxacin wird außerdem über eine gute In-vitro-Wirksamkeit gegenüber pathogenen Darmbakterien (42), Mykoplasmen (87), Chlamydien (5) wie auch *Neisseria gonorrhoeae* (91) berichtet. Etwas problematisch erscheint aber gerade im Zusammenhang mit *Staphylococcus aureus* die auch bei den neuen Quinolonen immer wieder geäußerte Befürchtung einer raschen Resistenzsteigerung unter breiter Anwendung (9, 34, 56).

Die Resistenzen gegenüber Gyrasehemmern könnten darauf beruhen, daß die Permeation des Chemotherapeutikums zum Ort der DNS-Synthese in der Bakterienzelle erschwert ist. Über den genauen Mechanismus ist bisher allerdings nichts bekannt.

Beeinflussungen der Empfindlichkeit gegenüber Gyrasehemmer können aber auch durch Mutationen am DNS-Synthese-Apparat auftreten. Unter 1.2.2. war erläutert worden, daß die DNS-Gyrase aus einer A- und einer B-Untereinheit besteht. Die beiden Genorte liegen im Chromosom wahrscheinlich so weit voneinander entfernt, daß Mutationen des einen Ortes vorlie-

gen können, ohne daß der andere Ort davon betroffen sein muß. Diese Mutationen können nun zur Folge haben, daß die Empfindlichkeit des DNS-Synthese-Apparates auf Gyrasehemmer ab- oder zunimmt. Aus den geschilderten Einflüssen lassen sich deshalb verschiedene Resistenzspektren verstehen, welche als Nal- (für Nalidixinsäure) Mutanten bezeichnet werden (30).

Die antibakterielle Aktivität wird in vivo wesentlich vom Verlauf der Chemotherapeutikum-Konzentration bestimmt. Diese kann in vitro annäherungsweise durch die Serum- und Gewebepharmakokinetik des zu untersuchenden Chemotherapeutikums wiedergegeben werden. Bei weitgehender Übereinstimmung der MHK-Werte gegenüber grampositiven Kokken bestehen zwischen den neuen Quinolonen bemerkenswerte pharmakokinetische Unterschiede, was in der Differenz der Serumhalbwertszeiten zum Ausdruck kommt (8). Daraus folgt, daß bakterielle Erreger unterschiedlichen Konzentrationen des eingesetzten Quinolons in verschieden langen Einwirkungszeiten ausgesetzt sind. Dieses substanzspezifische Charakteristikum bleibt aber bei normalen MHK-Bestimmungen unberücksichtigt.

Es erscheint deshalb wissenwert, wie stark die bakterizide Wirkung bei einem neuen Gyrasehemmer wie Ofloxacin in vitro, bei Zugrundelegung der im menschlichen Blut wie auch sonstigem menschlichen Gewebe (Haut) tatsächlich zu erzielenden Konzentrationsprofilen, ausgeprägt ist, nicht zuletzt, um die Frage beantworten zu können, ob Ofloxacin in weiteren klinischen Studien bei Staphylococcus aureus bzw. Streptococcus pyogenes-Infektionen, insbesondere der Haut, geprüft werden sollte.

Dazu wird im folgenden auf das erstmals von Grasso beschriebene Modell (44) zurückgegriffen, das bislang vor allem bei gramnegativen Stäbchen (59, 119), von einer Arbeitsgruppe der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der LMU-München aber auch bei gramnegativen Kokken (63), und ansatzweise sogar im mykologischen Bereich (65), verwendet wurde.

2. Material und Methoden

2.1. Klassifizierung des Untersuchungsmaterials

Aus dem klinischen Untersuchungsmaterial der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der LMU-München wurden rezente Staphylo- und Streptokokkenstämme untersucht. Dabei wurden von jeder Bakterienart aufgrund der routinemäßig erstellten Antibiotogramme zwei Isolate mit unterschiedlicher Penicillin G-Empfindlichkeit ausgewählt und vor Beginn der Untersuchung noch einmal reklassifiziert.

2.1.1. Staphylococcus aureus (S.aureus)-Klassifikation

Die Spezieszugehörigkeit der beiden ausgewählten Hautisolate (Stamm-Nr.2057/85, Stamm-Nr.1347/85) wurde noch einmal anhand folgender Kriterien eingehend überprüft:

1. Gramfärbung

Im mikroskopischen Präparat waren grampositive, d. h. dunkelblaue, runde Kokken zu sehen, durchschnittlich ca. 1 μm groß, die unregelmäßige Haufen bildeten (Abb. 8).

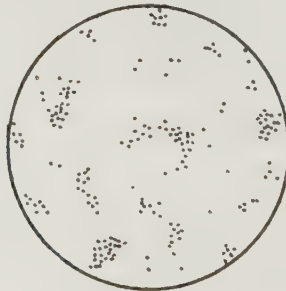


Abb. 8: Gram-Präparat der S.aureus-Agarkultur, Vergrößerung 800-fach.

2. Koloniemorphologie und Hämolyse

Die beiden Stämme wuchsen auf Blutagarplatten als glatte, gewölbte, undurchsichtige, weißlich-gelbliche Kolonien und zeigten bei Bebrütung mit 37°C eine rasche Lyse der umgebenden Schafblutkörperchen.

3. Plasmakoagulase-Test

Von wesentlicher diagnostischer Bedeutung für *S.aureus*-Stämme war die charakteristische Bildung von Plasmakoagulase. Es handelte sich hierbei um ein Gerinnungsferment, das die Koagulierung von Kaninchenplasma (BBL, Microbiology Systems, Cockeysville, Md., USA) bewirkt.

Bei dem Test wurde also die an die Keime gebundene Koagulase, der "clumping factor", nachgewiesen, indem man Material des zu untersuchenden Stammes auf einem Objektträger mit einem Tropfen Kaninchenplasma verrieb. Bei beiden Isolaten zeigte sich eine rasche Klumpenbildung infolge der Präzipitation von Fibrin an der Oberfläche der Keime mit nachfolgender Verklebung. Zum Ausschluß einer "Spontanagglutination" wurde eine Kontrolle mit physiologischer Kochsalzlösung durchgeführt, die negativ verlief.

4. Biochemische Reaktionsreihe

Der enzymatische Test (APISTAPH, Api System S. A., Montalieu Vercieu, F) bestand aus einer Reihe von Mikroröhrchen, die die Substrate für 20 biochemische Leistungen des Untersuchungsmaterials enthielten; 17, 60). Nach Inkubation der Testreihe mit einer Suspension der Testkeime für 24 Stunden bei 37°C konnte nach Zugabe der Reagenzien das Ergebnis abgelesen und interpretiert werden (72, 95).

Stamm-Nr.2057/85 lieferte dabei folgende biochemische Reaktionen: Säurebildung im Testmedium bei Zugabe von D-Glukose, D-Fruktose, D-Mannose, Maltose, Laktose, D-Trehalose, Saccha-

rose und D-Mannit (Nutzung des Zuckers als Kohlenstoff- und Energiequelle), bei Xylit, D-Melibiose, D-Xylose und Raffinose blieb diese Reaktion aus. Kaliumnitrat wurde zu Nitrit reduziert, alkalische Phosphatase war vorhanden, ebenso wie Arginindihydrolase und Urease. Außerdem kam es mit dem Substrat Natriumpyruvat zur Bildung von Acetyl-methyl-carbinol. Diese Resultate wurden in eine Codenummer umgewandelt (in diesem Fall ergab sich 6736153) und mit Hilfe einer Indexliste als *Staphylococcus aureus* identifiziert.

Das zweite Hautisolat, Stamm-Nr.1347/85, zeigte im APISTAPH-Test eine identische enzymatische Tätigkeit, d. h. alle getesteten Reaktionen liefen mit den oben geschilderten Ergebnissen ab. Damit war dieser Stamm als eindeutig zur Spezies *S.aureus* gehörig identifiziert.

2.1.2. Streptococcus pyogenes (S.pyogenes)-Klassifikation

Zur Überprüfung der Spezieszugehörigkeit der beiden ausgewählten *S.pyogenes*-Hautisolate (Stamm-Nr.337585, Stamm--Nr.4210/85) waren sowohl serologische als auch biochemische Methoden erforderlich; eine ausreichende Genauigkeit bei der Diagnostik liefert nur eine Verbindung dieser beiden Techniken. Folgende Kriterien wurden deshalb noch einmal eingehend getestet:

1. Färbepräparat nach Gram

Nach dem Lufttrocknen, Fixieren und Färben des Präparates nach Gram stellten sich die beiden untersuchten Stämme im Mikroskop als grampositive, d. h. als angefärbte, dunkelblaue, verschieden lange Kettenkokken, mit vielen Diploformen, dar (Abb.9).



Abb. 9: Gram-Präparat der *S. pyogenes*-Agarkultur, Vergrößerung 800-fach

2. Koloniemorphologie und Hämolyse

Auf Blutagarplatten bildeten sich grau-weißliche, z.T. glatte, z.T. rauhe, undurchsichtige Kolonien bis etwa 2 mm Durchmesser. Die Isolate der Gruppe A nach Lancefield konnten auch durch den Hämolysetyp klassifiziert werden, den sie auf Blutagarplatten (Columbia-Agar, BBL, Microbiology Systems, Cockeysville, Md., USA; mit 5 % Hammelblut) ausbildeten (37), denn 96 Prozent der zur Gruppe A gehörigen Erreger sind β -hämolisierend, d. h. es bildete sich ein relativ großer, farbloser, durchsichtiger Hof um die Kolonien. Bei mikroskopischer Untersuchung (optische Ebene der Nährbodenoberfläche eingestellt) sah man zellfreie Zonen um die Kolonien infolge des vollständigen Abbaus der Erythrozyten durch die Wirkung echter Hämolsine.

Gruppe B und Gruppe C-Streptokokken können zwar ebenfalls eine β -Hämolyse erzeugen, aber sie sind bei Hautinfektionen äußerst selten anzutreffen (36).

3. Objektträgertest mit einem sensibilisierten Latex-Reagens für die rasche Gruppenbestimmung β -hämolisierender Streptokokken A, B, C, D, F und G nach Lancefield (bio Mérieux, Charbonnières les Bains, F).

Durch Agglutination von mit Gruppen-spezifischen Kaninchen-Immunglobulinen beschichteten Latex-Partikeln, wurden nach enzymatischer Extraktion die Polysaccharid-Antigene der Streptokokken-Zellwände untersucht.

Dafür wurde zuerst eine dichte Emulsion (2 - 3 Ösen einer Reinkultur) in 0,4 ml Enzym für die Extraktion hergestellt, anschließend eine Stunde im Wasserbad bei 50°C inkubiert, danach 10 min. bei 1200 g zentrifugiert. Der Überstand, der den Extrakt darstellte, wurde abgehebert.

Für die Gruppenbestimmung werden die Latex-Suspensionen der verschiedenen Gruppen gut homogenisiert und auf dem Objektträger in die dafür vorgesehenen Felder aufgetragen. Der Extrakt wurde sorgfältig ohne Bakterien entnommen, und auf jeden Objektträger ein Tropfen neben die Latex-Suspension aufgebracht. Nun wurden Suspension und Extrakt vermischt und auf der Oberfläche des Feldes ausgestrichen. Danach bewegte man den Objektträger leicht rotierend.

Als Ergebnis zeigte sich bei Stamm-Nr.3375/85, wie auch bei Stamm-Nr.4210/85, im Feld der Gruppe A eine sichtbare Anhäufung der Latexpartikel, also das Auftreten einer Agglutination mit der entsprechend bearbeiteten Latex-Suspension.

Alle anderen Felder zeigten als negative Reaktion eine homogene Mischung der beiden Flüssigkeiten.

4. Biochemische Reaktionen

Die Testreihe (API 20 STREP, Api System S. A., Montalieu Vercieu, F) bestand aus einem Streifen mit 20 Röhrchen, in denen die Substrate in dehydrierter Form enthalten waren. Mit Hilfe dieser Substrate ließ sich einerseits die Aktivität von Enzymen, und andererseits die Fermentation von Kohlenhydraten nachweisen (77, 116).

Von einer Reinkultur auf festem Medium ausgehend, stellte man eine dichte Suspension her und beimpfte damit den Streifen. Nach vier Stunden gab man die entsprechenden Reagenzien zu

und konnte die Ergebnisse ablesen. Stamm-Nr.3375/85 zeigte dabei folgendes enzymatisches Profil: fehlende Acetoinproduktion, keine Hydrolyse, fehlende Tätigkeit von β -Galaktosidase, Vorhandensein von Pyrrolidonylarylamidase-Aktivität, ebenso von Phosphatase, Leucinarylamidase und Arginindehydro-lase. Die Säurebildung fehlte mit Ausnahme von Lactose und Trehalose bei den anderen getesteten Kohlehydraten (Ribose, Arabinose, Mannitit, Sorbit, Inulin, Raffinose, Stärke und Glykogen). Der Vergleich mit einer Tabelle ließ nun im Zusammenhang mit den anderen Resultaten die eindeutige Identifikation der getesteten Spezies als *Streptococcus pyogenes* der Gruppe A nach Lancefield zu.

(Lancefield klassifizierte die Streptokokken in Gruppen von A bis L auf der Basis einer immunologischen Reaktion ihrer Zellwand-Kohlenwasserstoffe; 68, 69.)

2.2. MHK-Bestimmung von Penicillin G und Ofloxacin gegenüber den oben genannten Bakterienstämmen

Alle Untersuchungen wurden mit einem üblichen Agardilutions-test durchgeführt: Petrischalen (9 cm Durchmesser), die das Nährmedium mit der entsprechend abgestuften Verdünnungsreihe von Penicillin- bzw. Ofloxacinlösungen enthielten, wurden mit einem Multipointinoculator (MA 1, Mast Laboratories, Liverpool, GB) beimpft. Dafür wurden zuvor alle Stämme in typischer Soja-Bouillon (Trypticase Soy Broth, BBL, Microbiology Systems, Cockeysville, Md., USA) über Nacht inkubiert. Anhand einer erstellten Eichkurve konnte nun eine photometrische Keimdichtenbestimmung der so gewonnenen Bakteriensuspension vorgenommen werden (Photometer Spectronic 20, Bausch u. Lomb, Unterhaching, D). Überall wurde die Bakteriendichte auf ca. 10^8 koloniebildende Einheiten pro ml eingestellt, was einer photometrischen Dichte von 0,15 bei 500 nm entsprach. Um eine eventuelle Abhängigkeit der MHK von der Inokulumgröße

bestimmen zu können, wurde jede Bakteriensuspension unverdünnt und jeweils in Zehnerschritten bis 10^3 fach verdünnt aufgetragen, so daß jeder Stamm schließlich mit 10^2 bis 10^5 Keimen pro Impfstelle auf die antibiotikahaltigen Nährböden aufgebracht wurde. Die Ablesung erfolgte nach 24stündiger Bebrütung bei 37°C . Als minimale Hemmkonzentration (MHK) wurde diejenige niedrigste Konzentration angesehen, die gerade sichtbares Wachstum verhinderte. Die unter diesen Voraussetzungen ermittelten MHK-Werte gegenüber den oben genannten Bakterienstämmen zeigen Tab. 1 und Tab. 2.

2.2.1. MHK-Werte gegenüber S.aureus-Hautisolaten

Penicillin G wurde gelöst und auf unterschiedliche Konzentrationen gebracht, dabei wurde die höchste getestete Arzneistoffkonzentration von $64\text{ }\mu\text{g/ml}$ immer wieder im Verhältnis 1 : 2 verdünnt bis zur unteren Grenze von $0,004\text{ }\mu\text{g/ml}$.

Ofloxacin wurde mit Hilfe der von Hoechst zur Verfügung gestellten Lösungsvorschrift (Einwaage + $0,2\text{ ml}$ Natronlauge, - $0,1\text{ mol/l}$ -, Merck, Darmstadt, D + 1 ml Aqua destillata + $0,2\text{ ml}$ Salzsäure - $0,1\text{ mol/l}$ -, Merck, Darmstadt, D + $x\text{ ml}$ Aqua dest.) gelöst und eine Verdünnungsreihe wie oben beschrieben hergestellt, wobei die höchste getestete Arzneistoffkonzentration $32\text{ }\mu\text{g/ml}$, die niedrigste $0,062\text{ }\mu\text{g/ml}$ betrug. Als Nährmedium wurde bei beiden MHK-Bestimmungen Mueller-Hinton-Agar (BBL, Microbiology Systems, Cockeysville, Md., USA) benutzt.

Nach ca. 24 Stunden konnten die Testergebnisse abgelesen werden; sie sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Keime/Impfstelle	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
MHK Stamm-Nr.1347/85				
Penicillin G [$\mu\text{g/ml}$]	64,0	16,0	8,0	8,0
Ofloxacin [$\mu\text{g/ml}$]	0,5	0,5	0,5	0,5
MHK Stamm-Nr.2057/85				
Penicillin [$\mu\text{g/ml}$]	0,064	0,064	0,064	0,064
MHK Ofloxacin [$\mu\text{g/ml}$]	0,5	0,25	0,25	0,25

Tab. 1: MHK-Werte der *S.aureus*-Hautisolate gegenüber Penicillin G und Ofloxacin

2.2.2. MHK-Werte gegenüber *S.pyogenes*-Hautisolaten

Gelöstes Penicillin G wurde, wie unter 2.2.1. beschrieben, auf unterschiedliche Konzentrationen gebracht, wobei hier aufgrund der voraussichtlichen Penicillinsensibilität die höchste getestete Chemotherapeutikumkonzentration 0,5 $\mu\text{g/ml}$, die niedrigste 0,001 $\mu\text{g/ml}$ betrug.

Ofloxacin wurde ebenso, wie unter 2.2.1. beschrieben, gelöst; die daraus hergestellte Verdünnungsreihe entsprach im Start- und Endpunkt dem für die *S.aureus*-Isolate verwendeten Spielraum (32 $\mu\text{g/ml}$ bis 0,062 $\mu\text{g/ml}$).

Als Nährmedium für die beiden *S.pyogenes*-Kolonien wurde Columbia-Agar (BBL, Microbiology Systems, Cockeysville, Md., USA) mit 5 Prozent Hammelblut verwendet.

Nach ca. 36 Stunden konnten die Ergebnisse dieser Bestimmung abgelesen werden; sie werden in Tabelle 2 dargestellt.

Keime/Impfstelle	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
MHK Stamm-Nr.4210/85				
Penicillin [$\mu\text{g/ml}$]	0,032	0,032	0,016	0,008
Ofloxacin [$\mu\text{g/ml}$]	1,0	1,0	1,0	0,5
MHK Stamm-Nr.3375/85				
Penicillin [$\mu\text{g/ml}$]	0,064	0,032	0,016	0,008
Ofloxacin [$\mu\text{g/ml}$]	2,0	2,0	1,0	1,0

Tab. 2.: MHK-Werte der *S.pyogenes*-Hautisolate gegenüber Penicillin G und Ofloxacin

2.3. Chemotherapeutika

Als Chemotherapeutikum aus der Gruppe der Quinolone wurde Ofloxacin (HOE 280, DL 8280) gewählt, das freundlicherweise von der Firma Hoechst AG (Frankfurt-Hoechst, D) als Reinsubstanz für Laborzwecke zur Verfügung gestellt wurde. Die Strukturformel, wie auch die Summenformel dieser chemischen Verbindung, gibt Abbildung 10 wieder

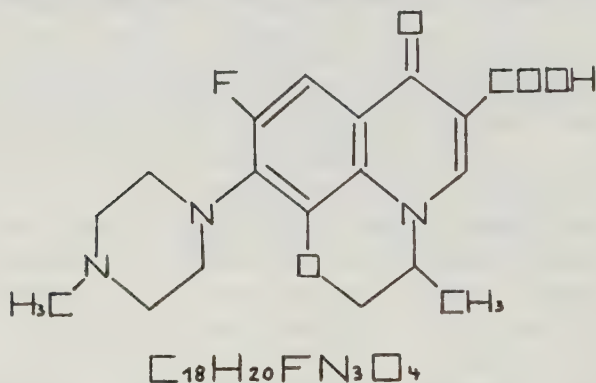


Abb. 10: Struktur- und Summenformel von Ofloxacin (HOE 280, DL 8280)

Ofloxacin ist ein neuer Gyrasehemmer, dessen mikrobiologische Aktivität ein breites Keimspektrum erfaßt. Chemisch unterscheidet er sich von den anderen Vertretern der Gruppe dadurch, daß an den Chinolinkern zusätzlich ein Oxazinring angefügt ist (Abb. 10). Das antibakterielle Spektrum von Ofloxacin umfaßt neben der bereits für diese Substanzgruppe bekannten Aktivität gegen gramnegative Stäbchen auch Wirkung bei grampositiven Kokken und einigen Anaerobiern (21, 24, 31, 43, 66, 103, 104, 105, 113, 127).

2.4. Kulturmedien

Die Vermehrung der Staphylokokken und Streptokokken im Flüssigmedium der Hauptversuche erfolgte in tryptischer Soja-Bouillon (Trypticase Soy Broth, BBL, Microbiology Systems, Cockeysville, Md., USA), die sich aus folgenden Bestandteilen zusammensetzte: Tryptisches Pepton 17 g, pflanzliches Pepton 3 g, Natriumchlorid 5 g, Dikaliumphosphat 2,5 g und Traubenzucker 2,5 g. Diese Mengenangaben beziehen sich auf einen Liter Flüssigkeit.

Dieses Medium erlaubte nicht nur die Anzüchtung und Vermehrung der relativ genügsamen Staphylokokken, die sich auch in Minimalnährlösungen noch gut teilen würden, sondern es stellte ebenso ein brauchbares Flüssigmedium zur Kultivierung der empfindlichen Streptokokken dar, wenngleich das Wachstum dieser Spezies deutlich hinter dem der Staphylokokken zurückblieb.

In der Praxis wurde der gesamte Bedarf an flüssigem Kulturmedium pro Hauptversuch (ca. 2,5 - 2 Liter) in einem geeigneten Gefäß angemischt, anschließend auf die verschiedenen Gaswaschflaschen und Reagenzgläser verteilt und sofort sterilisiert. Dadurch konnte einerseits die exakt gleiche Zusammensetzung des Flüssigmediums über den gesamten Versuchsablauf gewährleistet werden, und andererseits wurde durch die schnelle Sterilisation ein eventueller Nährmediumverbrauch durch eingedrungene Fremdkeime verhindert. Die Verwendung dieser tryptischen Sojabouillon, die bei beiden Spezies nach einer gewissen Zeit, die zur Umstellung von den Festnährböden auf die flüssige Kultivierung diente, zu einem logarithmischen Wachstum führte, erlaubte somit einen direkten Vergleich zwischen den beiden Bakterienarten.

2.5. Simulation der Ofloxacinspiegel im Blut und im Gewebe

Bei den präklinischen Daten von Ofloxacin, die über seine Eignung für die Therapie von Infektionskrankheiten etwas auszusagen versuchen, stellt die minimale Hemmkonzentration (MHK) ein wichtiges Kriterium dar; doch läßt sich der therapeutische Erfolg in den meisten Fällen nicht allein auf Grund der MHK-Werte vorhersagen. Andere meßbare Größen sind Blut- und Gewebespiegel (22, 25, 123), deren Simulation die Wirkstoffverteilung im menschlichen Körper in der Zeit, die maximal auftretende Wirkstoffkonzentration im Blut und am Wirkort und die damit verbundene Gewebegängigkeit besser darzustellen vermögen als der statische Bezugspunkt der MHK-Bestimmung.

2.5.1. Spiegelprofil in Serumflüssigkeit

Der vorliegenden Untersuchung wurde eine Ofloxacin-Pharmakokinetik zugrunde gelegt, die bei einer Studie von Wise et al (123) gefunden worden war. Dabei war sechs gesunden, nüchternen Probanden eine einmalige orale Dosis von 600 mg Ofloxacin verabreicht worden, zusammen mit 300 ml Wasser. In den nächsten zwei Stunden erhielten sie noch einmal 200 ml Wasser, danach Frühstück. Anschließend wurden Essen und Getränke ad libitum eingenommen. Alle Blutproben zu den verschiedenen Zeitpunkten (siehe Tabelle 3) wurden durch intravenöse Dauerkatheter gewonnen. Die zentrifugierte Serumflüssigkeit wurde dazu benutzt, vorher gewogene sterile Petrischalen (Durchmesser 6 cm) zu beimpfen. Die Testplatten wurden danach noch einmal gewogen, um die eingebrachte Flüssigkeitsmenge genau bestimmen zu können. Dieser Antibiotika-Agardiffusionstest wurde jeweils innerhalb einer Stunde nach Probenentnahme durchgeführt, als Testkeim diente in dieser Studie Escher-

ichia coli 4004 (zur Verfügung gestellt von Bayer AG, Wuppertal, D), das Testmedium bestand aus Iso Sensitest Agar (cM 471, Oxoid Ltd., Basingstoke, Hants, GB). Die Standardkonzentrationen wurden in menschlichem Serum zubereitet, wobei auf jeder Testplatte die geeigneten Serum- bzw. Blasenflüssigkeits-Standardlösungen und die jeweilige Probe vorhanden waren. Die Aussagegenauigkeit der Testergebnisse war besser als ± 15 Prozent (gemessen an den Standardkonzentrationen), die untere Grenze der Empfindlichkeit dieser Methode lag bei $0,01 \mu\text{g/ml}$. Der Durchschnitt der maximalen Serumkonzentration lag bei $10,7 \mu\text{g/ml}$, jedoch zeigten sich hier große Unterschiede (Standardabweichung $\pm 6,4 \mu\text{g/ml}$). Beim entsprechenden Vergleich mit Norfloxacin (1, 124) und Ciprofloxacinstudien (23) lag dieser Wert um das vier- bzw. fünffache höher. Ofloxacin wurde von fünf der sechs Probanden rasch absorbiert, $T_{\max}$ lag hier bei 0,5 bis 1 h; ein Proband aber benötigte 3 h um die höchste gemessene Wirkstoffkonzentration zu erreichen, so daß als mittlere $T_{\max}$ 1,2 h ermittelt wurde (Standardabweichung 0,9 h).

Die pharmakokinetische Auswertung(41) der so gewonnenen Daten erfolgte mit Hilfe eines modifizierten "RIP"-Programms (50). Als Programmgrundlage diente dabei ein schon früher beschriebenes mathematisches Modell (siehe 2.6.) mit Gleichung $C = A \cdot (e^{-k_e \cdot t} - e^{-k_a \cdot t})$ zur Simulation des zeitlichen Verlaufs der mittleren Ofloxacinkonzentration in Serumflüssigkeit (Abb. 11), wobei als Ergebnis eines Programmdurchlaufs die Variablen der Gleichung so festgelegt wurden, daß die damit berechnete Kurve, bis auf geringe Abweichungen die gemessenen Mittelwerte berührte und somit die In-vivo-Situation mathematisch ausgezeichnet erfaßt wurde.

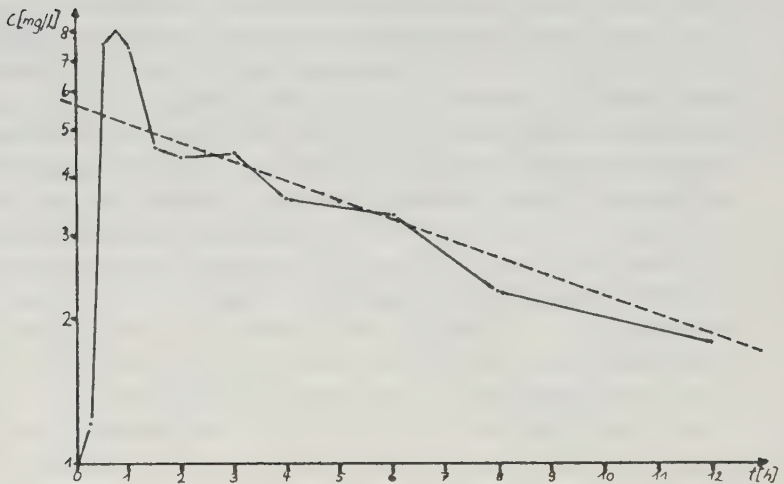


Abb. 11: Ofloxacin-Konzentration (Mittelwert) in Serumflüssigkeit beim Menschen nach einmaliger peroraler Gabe von 600 mg (gestrichene Linie: Eliminationstangente, siehe 2.6.4.)

Dieses Programm lieferte die Werte von A (modifizierte Anfangskonzentration), k_a (Absorptionskonstante) und k_e (Eliminationskonstante), aus denen sich alle versuchsrelevanten Parameter errechnen ließen, außerdem t_{lag} (Zeitverzug der RIP-Kurve), notwendig zur Berechnung der Ofloxacin-Konzentration in der Zeit, siehe 2.8., Tabelle 7 und 8, sowie die mittlere Halbwertszeit der Elimination ($T_{1/2e}$) und der Absorption ($T_{1/2a}$).

Die RIP-Anpassung an die Serumflüssigkeits-Konzentrationen lieferte folgende Zahlenwerte:

$$\begin{array}{lll}
 t_{lag} = 0 & k_a = 2,9 & T_{1/2a} = 0,24 \\
 A = 5,90 & k_e = 0,10 & T_{1/2e} = 7,0
 \end{array}$$

Der Wert für $T_{1/2e}$ erschien größer als bei bisher veröffentlichten Untersuchungen (86, 98), doch ließ sich diese Tatsache mit der Dosisabhängigkeit der Halbwertszeit erklären. Es lautete daher die Bateman-Funktion der Serumspiegel-Simulationskurve in diesem Fall:

$$C_p = 5,90 \cdot (e^{-0,10 \cdot t} - e^{-2,90 \cdot t})$$

2.5.2. Spiegelprofil in Kantharidinblasenflüssigkeit

Die Messung der Ofloxacin-Konzentration, die nach einmaliger oraler Gabe von 600 mg in kutaner Blasenflüssigkeit gefunden wurde, erfolgte mit Hilfe eines Modells, das eine gewisse Ähnlichkeit mit einem leicht entzündlichen Exsudat zeigt (122). Dafür wurden den Probanden am Abend vor dem Versuch zwei 1 cm x 1 cm große, 0,2 prozentige Kantharidinpflaster am Vorderarm befestigt. Blasenflüssigkeit wurde nun zu den verschiedenen Meßzeitpunkten (siehe Tabelle 3) entnommen, die Blasen nach jeder Entnahme mit einem Wundsprühverband (Nobecutane, Astra Chemicals Ltd., Watford, GB) wieder verschlossen. Bei jeder Entnahme wurden annähernd $3 \times 25 \mu\text{l}$ Kantharidin-Blasenflüssigkeit entnommen, und, wie unter 2.5.1. beschrieben, auf Testplatten aufgebracht.

Zeit	Serum	Blasenflüssigkeit
15 min	1,2 ($\pm 1,8$)	*
30 min	7,7 ($\pm 7,6$)	0,4 ($\pm 0,5$)
45 min	8,1 ($\pm 5,3$)	*
60 min	7,4 ($\pm 5,0$)	1,6 ($\pm 1,5$)
90 min	4,6 ($\pm 2,0$)	*
2 h	4,4 ($\pm 1,3$)	3,5 ($\pm 1,3$)
3 h	4,5 ($\pm 1,0$)	4,0 ($\pm 1,4$)
4 h	3,6 ($\pm 0,6$)	4,3 ($\pm 1,2$)
5 h	3,5 ($\pm 0,4$)	4,6 ($\pm 0,7$)
6 h	3,3 ($\pm 0,6$)	4,7 ($\pm 1,5$)
8 h	2,3 ($\pm 0,4$)	4,2 ($\pm 1,2$)
12 h	1,8 ($\pm 0,4$)	2,6 ($\pm 0,5$)
24 h	0,6 ($\pm 0,1$)	*

* nicht getestet

Tab. 3: Durchschnittliche Konzentration ($\mu\text{g/ml}$) von Ofloxacin ($\pm$ Standardabweichung) im Blut und im Gewebe

Nach Auswertung des Agardiffusionstests (Einzeldaten siehe Tab. 3) zeigte sich, daß Ofloxacin ziemlich langsam ins Gewebe penetrierte, wurde doch die maximale Gewebskonzentration (C_{max}) von 5,2 $\mu\text{g/ml}$ (Standardabweichung $\pm 0,9 \mu\text{g/ml}$) erst im Durchschnitt nach 5,3 Stunden (Standardabweichung $\pm 0,8 \text{ h}$) erreicht. Wirksame mittlere Spiegel von 4 $\mu\text{g/ml}$ und darüber waren aber bereits nach drei Stunden vorhanden und blieben bis acht Stunden nach Einnahme erhalten, so daß die mittleren Kantharidinblasenflüssigkeitsspiegel die mittleren Serumspiegel ab etwa 4 h nach Wirkstoffeinnahme überstiegen (siehe Tab. 3).

Dabei betrug die prozentuale Gewebegängigkeit des Arzneistoffes in Blasenflüssigkeit (d. h. die maximale Gewebespiegelkonzentration wird prozentual zur maximalen Serumspiegelkonzentration ins Verhältnis gesetzt) im Durchschnitt 57,4 Prozent, was in etwa anderen Vertretern dieser Substanzklasse gleichkam.

Auch bei den in Kantharidinblasenflüssigkeit gefundenen Konzentrationen erfolgte eine pharmakokinetische Auswertung

mittels RIP-Programm zur Simulation dieser durchschnittlichen Ofloxacinkonzentration im Gewebe in der Zeit (Abb. 12)

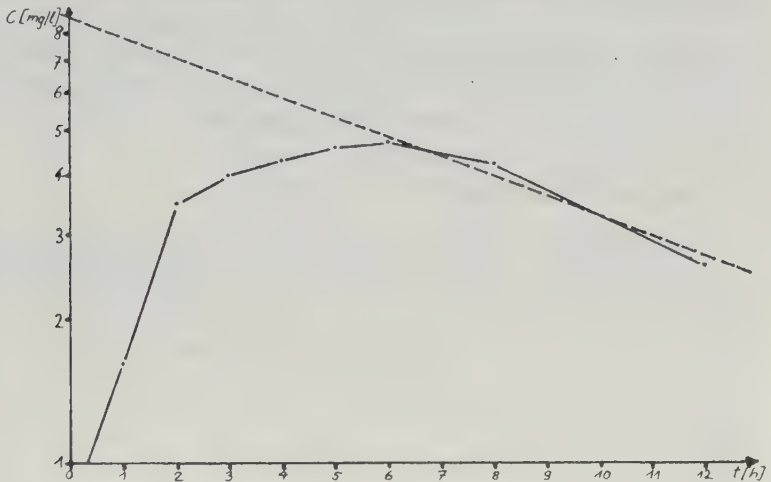


Abb. 12: Ofloxacin-Konzentration (Mittelwert) in Kantharidinblasenflüssigkeit beim Menschen nach einmaliger peroraler Gabe von 600 mg

Die beschriebene RIP-Anpassung an die Kantharidinblasenflüssigkeitkonzentrationen brachte folgendes Ergebnis:

$$\begin{array}{lll}
 t_{\text{lag}} = 0,335 & K_a = 0,325 & T_{1/2a} = 2,13 \\
 A = 14,99 & K_e = 0,136 & T_{1/2e} = 5,08
 \end{array}$$

Da auch in diesem Fall die Voraussetzung einer fast 100-prozentigen Bioverfügbarkeit gegeben war, lautete die Bateman-Funktion der Kantharidinblasenflüssigkeit-Simulationskurve:

$$C_G = 14,99 \cdot (e^{-0,136 \cdot t} - e^{-0,235 \cdot t})$$

2.6. Modellapparat und Untersuchungsgang

Um die dargestellten Chemotherapeutikaspiegel (siehe 2.5.) auf die Testkeime (siehe 2.1.) einwirken zu lassen, wurde ein Versuchsmodell mit Flüssigmedium verwendet.

2.6.1. Entwicklung kinetischer Modelle

Die Entwicklung kinetischer In-vitro-Modelle zum Studium der chemotherapeutischen Aktivität hat großes Interesse gefunden, weil damit eine Möglichkeit aufgezeigt wurde, die in vivo gemessene Pharmakokinetik eines Chemotherapeutikums in gleicher Weise in vitro darzustellen (45).

Eines der ersten wichtigen Modelle, das in der Literatur beschrieben wurde, diente zum Studium der Chemotherapeutikum-Konzentration in der Harnblase bei der dort stattfindenden Verdünnung und Miktion (85). Weiterentwickelt kann man heute damit das renale Ausscheidungsprofil von Arzneistoffen simulieren (47). Das erste Kinetikmodell, das vereinfachte Antibiotika-Spiegel reproduzierte, die im Serum beobachtet worden waren, das aber noch keine konstante Verdünnung zeigte, wurde 1968 vorgestellt (102). Die Versuchsanordnung bestand aus Flaschen, die Bakterienkulturen mit einem Chemotherapeutikum enthielten. In diese Flaschen wurde nun aus Reservoirgefäßen steriles Flüssigmedium mit oder ohne Chemotherapeutikum gepumpt, abhängig davon, ob konstante Spiegel oder mit der Zeit fallende Spiegel simuliert werden sollten. Der Nachteil, daß für die Simulation einer raschen Elimination große Mengen Flüssigkeit benötigt wurden, konnte durch eine Weiterentwicklung behoben werden. Nishida et al (82) benutzte stattdessen einen Versuchsbehälter, der die Bakterienkulturen mit dem Chemotherapeutikum in Kontakt hielt. Dabei konnte die Konzentration in vorgegebenen Intervallen durch Hinzugeben einer konzentrierten Lösung des Wirkstoffes oder vom normalen

Medium verändert werden. Da jedoch die Verdünnung periodisch und nicht kontinuierlich erfolgte, spiegelte die Wirkstoffkonzentrationskurve bei den geschilderten Modellen nicht genau die In-vivo-Situation wieder.

Erst mit Modellen, in denen die Verdünnung kontinuierlich verlief und das Chemotherapeutikumvolumen konstant blieb, wurde es möglich, die beobachteten In-vivo-Spiegel besser zu simulieren. In einem frühen Modell dieses Typs, beschrieben von Otaga et al (88), wurde eine Luftpumpe zur Druckerzeugung benutzt und damit Flüssigkeit aus einem Reservoir in das Kulturgefäß gedrückt, aus dem die gleiche Menge wieder abfloß. Das Chemotherapeutikum wurde beiden Gefäßen hinzugefügt, so daß damit antibakterielle Effekte bei konstanter Konzentration beobachtet werden konnten.

Von Rowe & Morozowich (97) wurde schließlich ein einfaches Modell zur Simulation von Arzneistoff-Verteilungsprozessen vorgestellt, das die Grundlage für weitere Entwicklungen bildete (12, 40, 44, 79, 108). In der vorliegenden Arbeit fand eine von Grasso (44) modifizierte Form ihre Anwendung und diente hier zum Studium von Serum- und Gewebsflüssigkeitsspiegelprofilen.

2.6.2. Mathematische Grundlagen

Die im menschlichen Körper nach einer Arzneistoffapplikation stattfindenden Absorptions- Verteilungs- und Eliminationsprozesse lassen sich in befriedigender Weise mit dem schematisch in Abb. 13. dargestellten Versuchsaufbau nachvollziehen.

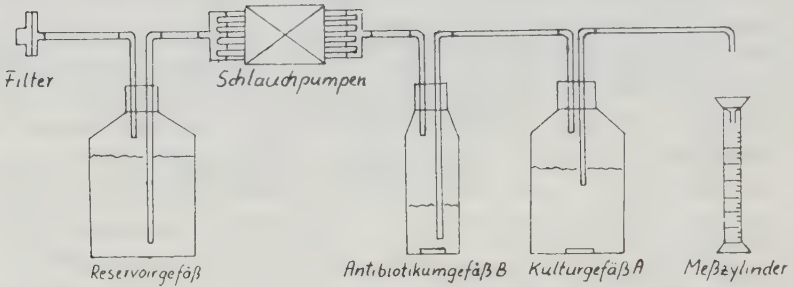


Abb.13: Schema des Versuchsaufbaus zur Untersuchung des antimikrobiellen Effekts von ständig schwankenden Ofloxacinkonzentrationen bei *S.aureus* und *S.pyogenes*

Mit diesem modifizierten Modellapparat erhält man zwei aufeinanderfolgende Verteilungsabläufe erster Ordnung und kann damit im Kulturgefäß A pharmakokinetische Prozesse mit Hilfe eines offenen Einkompartimentmodells simulieren, wie z. B. in diesem Fall das Anfluten der Ofloxacin-Konzentration im Blut und im Gewebe nach der einmaligen oralen Gabe von 600 mg, und als zweiten Prozeß die damit verbundene gleichzeitig einsetzende Elimination.

Der Zusammenhang der zu Versuchsbeginn vorliegenden Konzentration $C(0)$ mit der Dosis und dem Volumen läßt sich nach Grasso (44) ganz allgemein folgendermaßen beschreiben:

$$C(0) = \frac{D}{V_A} \quad (I)$$

Dabei gilt es zu beachten, daß bei Versuchsbeginn, also von dem Moment des Einschaltens der peristaltischen Pumpe an, in dem Chemotherapeutikumsgefäß B die Wirkstoffkonzentration exponentiell zu sinken beginnt, der Gleichung

$C(t) = C(0) \cdot e^{-K \cdot t}$ folgend, wobei $C(0)$ die Chemotherapeuti-

kumkonzentration zur Zeit $t = 0$ und K_e die Eliminationskonstante darstellt.

K_e und die zugehörige Halbwertszeit $T_{1/2e}$ sind Funktionen der Flußrate F (gesteuert durch die Schlauchpumpe) und des Volumens V_A im Kulturgefäß.

$$K_e = \frac{F}{V_A} \quad (II) \quad T_{1/2e} = \frac{\ln 2}{K_e}$$

Durch diesen Eliminationsprozeß in V_B wird nun gleichzeitig eine Absorption im Kulturgefäß V_A ausgelöst und natürlich, wiederum gleichzeitig, eine erneute Elimination.

Deshalb wird sich die Chemotherapeutikum-Konzentration im Kulturgefäß V_A in der Zeit als Überlagerung dieser beiden Prozesse darstellen, die sich mathematisch auf folgende Weise beschreiben läßt:

$$C(t) = C(0) \cdot \frac{K_a}{K_a - K_e} \cdot (e^{-K_e \cdot t} - e^{-K_a \cdot t}) \quad (III)$$

Auch die nun auftauchende Absorptionskonstante K_a , wie ihre zugehörige Halbwertszeit $T_{1/2a}$, läßt sich mit der Flußrate F und dem Volumen V_B im Chemotherapeutikagefäß in Verbindung bringen:

$$K_a = \frac{F}{V_B} \quad (IV) \quad T_{1/2a} = \frac{\ln 2}{K_a}$$

So ist es also möglich, durch Änderung der Anfangskonzentration $C(0)$, der Volumina V_A und V_B , und/oder der Pumpenleistung (ausgedrückt durch die Flußrate F) verschiedenste Konzentrationszeit-Profile zu simulieren.

2.6.3. Berechnung der Volumina

Um einerseits den Totraum in den Gefäßen A und B möglichst gering zu halten (dadurch wird es möglich, daß sich der durch die Schlauchpumpe erzeugte Druck ohne größere Verzögerung fortpflanzen kann und somit der Druckanstieg in allen Gefäßen gleichzeitig erfolgt) und andererseits den Durchfluß so einstellen zu können, daß trotz Keimausschwemmung aus dem Kulturgefäß A dort immer noch ein Wachstum der Restkultur gegeben war, wurde bei den S.aureus-betreffenden Versuchsreihen eine Flußrate von 30 ml/h (= 0,5 ml/min) gewählt. Die Konstanten der Elimination (K_e) bzw. der Absorption (K_a) waren mit dem RIP-Programm (siehe 2.5.1.) festgelegt worden. Nach Umformung von (II) und (IV) ergab sich dann für das S.aureus-Serumspiegelprofil:

$$V_A = \frac{F}{K_e} = \frac{30[\text{ml/h}]}{0,1[\text{h}^{-1}]} = 300,0[\text{ml}]$$

$$V_B = \frac{F}{K_a} = \frac{30[\text{ml/h}]}{2,9[\text{h}^{-1}]} = 10,34[\text{ml}]$$

Analog dazu waren die Volumina für das S.aureus-Kantharidin-blasenflüssigkeits-Spiegelprofil zu berechnen (Eliminations- bzw. Absorptionskonstanten durch RIP-Programm ermittelt, siehe 2.5.2.):

$$V_A = \frac{F}{K_e} = \frac{30[\text{ml/h}]}{0,136[\text{h}^{-1}]} = 220,58[\text{ml}]$$

$$V_B = \frac{F}{K_a} = \frac{30[\text{ml/h}]}{0,325[\text{h}^{-1}]} = 92,30[\text{ml}]$$

Bei den Versuchsreihen mit den *S.pyogenes*-Isolaten zeigte sich in Vorversuchen, daß die homogene Verteilung der Streptokokken im Ausleitungsrohr des Kulturgefäßes A durch die für die Staphylokokkenstämme gewählte Flußrate nicht sicher gewährleistet werden konnte, da der Magnetrührer am Boden des Gefäßes die im Glasrohr auszuleitende Flüssigkeitssäule nur ungenügend bewegte. Dieses Problem fand seine Lösung durch die optimale Anpassung der zwei Parameter Flußrate und Volumen an die erwünschten Bedingungen. Dazu wurde die Volumenkapazität des Kulturgefäßes A (0,5 l) maximal ausgenutzt und das Ausleitungsrohr soweit gekürzt, daß es nur noch geringfügig in das Flüssigkeitsmedium eintauchte, damit der Weg der Flüssigkeit zur Probenentnahme auf ein Minimum reduziert wurde. Diese Volumenerhöhung erforderte bei Simulation des gleichen Serumspiegelprofils laut (II) und (IV) gleichzeitig eine Erhöhung der Flußrate. Dabei wirkte es sich zusätzlich positiv aus, daß die zu bestimmende Probenflüssigkeit den Weg im Ausleitungsrohr nun schneller durchlaufen konnte. Das exponentielle Wachstum der Bakterienkultur im Kulturgefäß A wurde durch die Erhöhung der Flußrate nicht beeinträchtigt. So ergaben sich also bei einer vorgewählten Flußrate von 50 ml/h (= 0,83 ml/min) für das *S.pyogenes*-Serumspiegelprofil folgende Volumina:

$$V_A = \frac{F}{K_e} = \frac{50[\text{ml/h}]}{0,1[\text{h}^{-1}]} = 500,0[\text{ml}]$$

$$V_B = \frac{F}{K_a} = \frac{50[\text{ml/h}]}{2,9[\text{h}^{-1}]} = 17,24[\text{ml}]$$

Wiederum analog dazu erfolgte die Berechnung der Volumina für das S.pyogenes-Kantharidinblasenflüssigkeitsspiegelprofil:

$$V_A = \frac{F}{K_e} = \frac{50[\text{ml/h}]}{0,136[\text{h}^{-1}]} = 367,64[\text{ml}]$$

$$V_B = \frac{F}{K_a} = \frac{50[\text{ml/h}]}{0,325[\text{h}^{-1}]} = 153,84[\text{ml}]$$

Die Bouillonmenge im Reservoirgefäß richtete sich nach Versuchsdauer und Flußrate: So sollten sich bei $F = 30 \text{ ml/h}$ (S.aureus-Versuche) und $t = 8 \text{ h}$ mindestens $240 \text{ ml} + 30 \text{ ml}$ Flüssigkeit zum Füllen der Verbindungssteile $+ 30 \text{ ml}$ Sicherheitsreserve ($= 300 \text{ ml}$) über dem unteren Rand des im Reservoirgefäßes befindlichen Glasrohres befinden.

Bei $F = 50 \text{ ml/h}$ (S.pyogenes-Versuche) und gleicher Versuchsdauer war eine größere Flüssigkeitsmenge notwendig: mindestens $400 \text{ ml} + 30 \text{ ml} + 70 \text{ ml}$ Sicherheitsreserve ($= 500 \text{ ml}$) sollten sich hier über dem unteren Rand des Ausgangsrohres im Reservoirgefäß befinden.

2.6.4. Berechnung der Modellversuchsdosis

Prinzipiell ließ sich die Modellversuchsdosis auf drei verschiedenen Wegen ermitteln, die hier für Serumspiegel- und CBF-Spiegelversuche kurz dargestellt werden sollen.

a) Graphische Methode

Die Mittelwerte der Ofloxacin-Konzentration in Serum- bzw. Kantharidinblasenflüssigkeit wurden auf halblogarithmisches Millimeterpapier aufgezeichnet (Abb. 11 und 12, siehe 2.5.1. und 2.5.2.). An das so gewonnene Konzentrationsprofil wurde in der Eliminationsphase eine Tangente gelegt. Am Schnittpunkt dieser Geraden mit der X-

(Konzentrations-)Achse des Diagramms konnte nun der Wert von $C(0)$ in mg/l abgelesen werden, bei den vorliegenden Profilen ergaben sich 5,7 [mg/l], bzw. 8,7 [mg/l].

Nach Umformung von (I) folgte:

$$D = C(0) \cdot V_A$$

Alle gewünschten Modellversuchsdosen der Serum- bzw. CBF-Spiegelsimulation ließen sich nun bei bekannten Volumina (siehe 2.6.3.) ermitteln.

b) Berechnung mit Hilfe der Eliminations-(t)-Werte

Entscheidend für diese Berechnung von $C(0)$ mit Hilfe von (III) waren die $C(t)$ -Werte, bei denen die Absorption keinen wesentlichen Einfluß mehr ausübte, also in der Phase der vorwiegenden Elimination. Um den Schwankungen der Einzelwerte gerecht zu werden, wurde das arithmetische Mittel aus den betreffenden $C(t)$ -Werten gebildet (Tab. 4 und 5).

Nach Umformung von (III) folgt:

$$C(0) = C(t) \cdot \frac{K_a - K_e}{K_a \cdot (e^{-K_e \cdot t} - e^{-K_a \cdot t})}$$

t[h]	C(t)[mg/l]	$e^{-K_e \cdot t}$	$e^{-K_a \cdot t}$	$e^{-K_e \cdot t} - e^{-K_a \cdot t}$	C(0)[mg/l]
5	3,5	0,6065	$5,0 \cdot 10^{-7}$	0,6065	5,57
6	3,3	0,5488	$2,7 \cdot 10^{-8}$	0,5488	5,80
8	2,3	0,4493	$8,4 \cdot 10^{-11}$	0,4493	4,94
12	1,8	0,3001	$7,7 \cdot 10^{-16}$	0,3011	5,77
24	0,6	0,0907	$5,9 \cdot 10^{-31}$	0,0907	6,38

Tab.4.: Berechnung der Anfangskonzentration $C(0)$ aus den $C(t)$ -Werten der Eliminationsphase beim Serumspiegelprofil

Aus Tabelle 4 ergab sich für das Serumspiegelprofil ein $C(0)$ -Mittelwert von 5,69 mg/l (Standardabweichung $\pm 0,46$).

t[h]	C(t)[mg/l]	$e^{-K_e \cdot t}$	$e^{-K_a \cdot t}$	$e^{-K_e \cdot t} - e^{-K_a \cdot t}$	C(0)[mg/l]
4	4,3	0,5804	0,2725	0,3079	8,12
5	4,6	0,5066	0,1969	0,3097	8,63
6	4,7	0,4421	0,1422	0,2989	9,11
8	4,2	0,3368	0,0742	0,2626	9,30
12	2,6	0,1955	0,0202	0,1753	8,6

Tab. 5: Berechnung der Anfangskonzentration $C(0)$ aus den $C(t)$ -Werten der Eliminationsphase beim Kantharidinblasenflüssigkeits(CBF)-Spiegelprofil

Aus Tabelle 5 ergab sich für das CBF-Spiegelprofil ein $C(0)$ -Mittelwert von 8,75 mg/l (Standardabweichung $\pm 0,44$).

c) Berechnung mit Hilfe des RIP-Parameters A

Sollte, wie es bei dieser Studie der Fall war, eine pharmakokinetische Datenverarbeitung mit Hilfe des RIP-Programmes erfolgt sein, so steht als dritte Möglichkeit zur Berechnung der Anfangskonzentration $C(0)$ der vom RIP-Programm gelieferte Wert A (modifizierte Anfangskonzentration) zur Verfügung, der bereits in (III) seine Anwendung gefunden hatte.

$$A = C(0) \cdot \frac{K_a}{K_a - K_e}$$

Wurde dieser Ausdruck nach $C(0)$ umgeformt, so ergab sich:

$$C(0) = A \cdot \frac{K_a - K_e}{K_a} \quad (V)$$

Mit den Daten des unter 2.5. erwähnten RIP-Programms erhielt man schließlich die folgenden Ergebnisse:

Anfangskonzentration $C(0)$ der Serumspiegelprofile:

$$C(0) = 5,90[\text{mg/l}] \cdot (2,9[\text{h}^{-1}] - 0,10[\text{h}^{-1}]) : 2,90[\text{h}^{-1}] = 5,69[\text{mg/l}]$$

Anfangskonzentration $C(0)$ der CBF-Spiegelprofile:

$$C(0) = 14,99[\text{mg/l}] \cdot (0,325[\text{h}^{-1}] - 0,136[\text{h}^{-1}]) : 0,325[\text{h}^{-1}] = 8,71[\text{mg/l}]$$

Die Berechnung der Modellversuchsdosis D aus der durch eine der drei aufgezeigten Möglichkeiten ermittelten Anfangskonzentration $C(0)$ erfolgte nach Umformung von (I):

$$D = C(0) \cdot V_A$$

So ergaben sich mit Hilfe der unter 2.6.3 berechneten Volumina folgende Modellversuchsdosen:

S.aureus-Serumspiegelsimulation:

$$D = 5,69[\text{mg/l}] \cdot 0,3[\text{l}] = 1,71[\text{mg}]$$

S.pyogenes-Serumspiegelsimulation:

$$D = 5,69[\text{mg/l}] \cdot 0,5[\text{l}] = 2,85[\text{mg}]$$

S.aureus-Kantharidinblasenflüssigkeitsspiegelsimulation:

$$D = 8,71[\text{mg/l}] \cdot 0,220[\text{l}] = 1,91[\text{mg}]$$

S.pyogenes-Kantharidinblasenflüssigkeitsspiegelsimulation:

$$D = 8,71[\text{mg/l}] \cdot 0,367[\text{l}] = 3,19[\text{mg}]$$

2.6.5 Versuchsvorbereitung

Schon vor Versuchsbeginn wurden alle im Hauptversuch verwendeten Gefäße mit den entsprechenden Bouillonmengen gefüllt und autoklaviert, ebenso die Verbindungssteile, Schlauchpumpenansätze und diverse Reagenzgläser (zur Inkubation, Verdünnungsreihe, Probenentnahme).

Nachfolgend die Materialliste zur Durchführung eines Hauptversuches:

- 1 Reservoirgefäß (Gaswaschflasche, Normschliff 29/32, 1000 ml, Normschliffgerätebau, Wertheim, D)
- 1 Kulturgefäß (Gaswaschflasche, Normschliff 29/32, 500 ml, Normschliffgerätebau, Wertheim, D)
- 1 Antimykotikumgefäß (Gaswaschflasche, Normschliff 29/32, 250 ml, Normschliffgerätebau, Wertheim, D)
- 1 Vielfach-Schlauchpumpe (Desaga, Modell 131 900, Heidelberg, D)
- 1 Plastikwanne (65 x 35 x 25 cm)
- 1 Heizgerät (Thermomix 1420, Braun, Melsungen, D)
- 2 Magnetmotoren (IKA MAG-RO Motor, IKA-Werk, Stauffen, D)
- 2 Magnetrührer (Länge 30 mm, 20 mm, IKA-Werk, Stauffen, D)
- 1 Photometer (Spectronic 20, Bausch u. Lomb, Unterhaching, D)
- 1 Eppendorfpipette 200 μ l (Eppendorf Gerätebau Netheler + Hinz GmbH, Hamburg, D)
- div. Eppendorfpipettenspitzen, blau (Eppendorf Gerätebau Netheler + Hinz GmbH, Hamburg, D)
- Auslauf-Meßpipetten 2 ml
- 2 - 3 Inkubationsreagenzgläser (mit Flüssigmedium)
- div. Reagenzglasständer
- ca. 25 Reagenzgläser (leer)
- ca. 70 - 80 Reagenzgläser (gefüllt mit Flüssigmedium)
- 70 - 80 Nachschüttreagenzgläser (alugestöpselt, mit 1,8 ml Flüssigmedium)

div. Glasgefäße

ca. 40 Petrischalen mit Nährböden (30 ml Columbia-Agar, BBL, Microbiology Systems, Cockeysville, Md.,USA) + 5 % Hammelblut

1 Petrimat (K & B Grubbs Instrument GmbH, Düsseldorf, D)

4 - 5 Verbindungsteile (sterilisierbare Silicon- oder Gummischläuche, div. Längen)

2 Schlauch-Verteiler (Best.-Nr.132024 Desaga, Heidelberg, D)

1 Schlauchsatz C/6 (Best.-Nr.131941, Desaga, Heidelberg, D)

div. Einmalspritzen, 2 ml und 10 ml (Inject Luer, Braun, Melsungen, D)

ca. 40 Filterpapierscheiben (SM 114007, Sartorius, Göttingen, D)

13 - 14 Mikrofilter (Filter SM 16534K, Sartorius, Göttingen, D)

1 Rüttler (Best.-Nr.34524-200, Cenco instrumenten, Breda, NL)

1 mechanisches Zählgerät (Colony-Counter, New Brunswick, Offenbach, D)

1 Präzisions-Brutschrank (Typ B-BKE, Memmert GmbH, Schwabach, D)

1 Autoklav (Aigner, Nr.46-1HST-ED-L, München, D)

1 Gefriergerät (Modell KGE 3500, Bosch-Hausgeräte GmbH, München, D)

1 Platinöse

1 Meßzylinder, 250 ml (Hirschmann, EM techcolor, D)

1 Präzisionswaage (Sartorius, Typ 1712, Göttingen, D)

ca. 13 - 14 Eppendorf-Reaktionsgefäße Typ 3810, 1,5 ml (Eppendorf Gerätebau, Netheler + Hinz GmbH, Hamburg, D)

1 Filtergerät (SM 16608, Sartorius, Göttingen, D)

1 Wasserstrahlpumpe

1 Pinzette

1 Stoppuhr

1 Bunsenbrenner

2.6.6. Versuchsaufbau

Beim Versuchsaufbau erwies es sich als zweckmäßig, zumindest das Kulturgefäß A mit der entsprechenden Bouillonmenge und dem darin befindlichen Magnetrührer schon am Vorabend eines Hauptversuches im Autoklaven (siehe Liste) zu sterilisieren. Um ein Verkleben der Glaseinsätze mit den Gefäßen zu verhindern, wurde vor der Sterilisation ein dünner Aluminiumstreifen zwischen Einsatz und Gefäß geklemmt, der sofort nach Öffnen des Autoklaven wieder entfernt wurde, um die Sterilität nicht zu beeinträchtigen.

Am Versuchstag selbst wurde zunächst eine ausreichende Menge Aqua destillata in einer Plastikwanne (siehe Liste) mit Hilfe eines Umwälzheizgerätes (siehe Liste) auf 37°C erwärmt, so daß auch das Flüssigmedium des in der Wanne stehenden Kulturgefäßes ebenfalls diese Temperatur annehmen konnte.

Währenddessen erfolgte mit Hilfe einer Platinöse die Beimpfung der Inkubationsreagenzgläser mit einer ca. 24 - 36 Stunden alten Subkultur des zu untersuchenden Bakterienstammes. Um eine reproduzierbare Anfangskonzentration zu erzielen, wurde die Dichte photometrisch bestimmt. Sie wurde mit Hilfe einer Eichkurve so eingestellt, daß zum eigentlichen Versuchsbeginn *Staphylococcus aureus* in einer Keimdichte von 10^8 kolonienbildenden Einheiten (KbE/ml), *Streptococcus pyogenes* in einer Keimdichte von 10^7 KbE/ml in der Flüssigkeitsmenge V_A enthalten waren. Der Inhalt der Inkubationsreagenzgläser wurde nun unter sterilen Verhältnissen (= entscheidende Voraussetzung für die erfolgreiche Durchführung des Versuchs, da hier eingeschleppte Fremdkeime das Versuchsergebnis nachhaltig verfälschen können) in das Kulturgefäß A eingebracht, und von einem Magnetrührer (Magnetmotor unter der Wanne) bis zum Beginn des Versuchs ständig bewegt. Eine Vorlaufzeit von 60 Minuten diente zur Ausschaltung der lag-Phase, d. h. der Zeit, die die Bakterien benötigten, um nach

Umstellung auf das Flüssigmedium in eine Phase des logarithmischen Wachstums überzugehen.

In dieser Zeit erfolgte, soweit noch nicht geschehen, die Vorbereitung und eventuelle Sterilisation der restlichen, zum Versuchsaufbau nötigen Teile, die Einwaage (Präzisionswaage siehe Liste) der benötigten Chemotherapeutikmenge, und kurz vor Versuchsbeginn das Zusammensetzen des Systems.

Bei der praktischen Durchführung der Einwaage erwies es sich dabei als nützlich, etwas mehr als benötigt abzuwiegen, um bei der nachfolgenden Sterilfiltration (Filter siehe Liste) eine geringe Flüssigkeitsreserve zu besitzen. Die abgewogene Ofloxacinmenge wurde mit Hilfe von speziellem Wägepapier in ein sterilisiertes Glasgefäß eingebracht und nach der Lösungsvorschrift des Herstellers aufgelöst (Einwaage + 0,2 ml NaOH + 1ml Flüssigmedium + 0,2 ml HCl). Zur richtigen Einstellung der Anfangskonzentration in V_B diente dabei folgende Gleichung:

$$\frac{\text{Einwaage in mg (> D)}}{\text{Dosis (siehe 2.6.4.)}} \cdot V_B \text{ (siehe 2.6.3.)} = x \text{ ml}$$

Von dieser hinzuzufügenden Flüssigkeitsmenge wurden wegen des Lösungsansatzes 1,4 ml abgezogen, der Rest wurde dem Chemotherapeutikumansatz zugegeben. Von der Lösung wurde nun das Volumen V_B in das Chemotherapeutikumgefäß B sterilfiltriert (Filter siehe Liste); auch dieses Gefäß war mit einem Magnetrührer versehen, um während des gesamten Versuchsablaufs eine überall gleichmäßige Konzentrationsverteilung zu ermöglichen.

Beim Zusammensetzen des Systems stellte sich folgendes Vorgehen als zweckmäßig heraus: Zunächst erfolgte das Anschließen eines Schlauchstückes mit vorgeschaltetem Mikrofilter am Ansaugstutzen des Reservoirgefäßes R, danach das Anbringen der Verbindungsteile am Schlaucheinsatz, Herstellen der Verbindung mit dem Reservoirgefäß R, Einlegen des

Schlaucheinsatzes in die Schlauchpumpe und Entlüften dieses Teilsystems (Totraumverminderung), Anschließen der Pumpenableitung an das Gefäß B, Verbinden der Gefäße A+B und schließlich das Befestigen des ableitenden Glasröhrchens zum Probenentnahmezylinder an Gefäß A.

2.6.7. Versuchsdurchführung

Nach Einschalten der Schlauchpumpe zum Zeitpunkt $t = 0$ wurde aus dem Reservoirgefäß eine in der Zeiteinheit gleiche Menge flüssiges Nährmedium in das Chemotherapeutikumgefäß B eingebracht. In diesem befand sich eine definierte Chemotherapeutikummengende D , welche in dem Versuchsansatz der klinisch verabfolgten Dosis entsprach. Da es sich um ein geschlossenes System handelte, war gleichzeitig eine entsprechende Menge chemotherapeutikumhaltige Flüssigkeit in das Kulturgefäß A weiterbefördert worden, wie dies aus der Schemazeichnung hervorgeht (Abb. 13). In diesem Gefäß A befand sich zu Versuchsbeginn eine Suspension von sich rasch teilenden Bakterien. Aufgrund des gleichen Drucks im Gesamtsystem wurde wiederum aus diesem, für das Gewebe stehende Gefäß mit dem Volumen V_A eine entsprechende Flüssigkeitsmenge nach außen in ein Probenentnahmegefäß entleert, was zu den verschiedenen Meßzeitpunkten die Analyse von Keimdichte (siehe 2.7.) und tatsächlich erreichter Chemotherapeutikumkonzentration (siehe 2.8.) in dem zentralen Gefäß A erlaubte.

Zur Überprüfung der Stabilität der Flußrate wurde das sich nach außen entleerte Flüssigmedium in einem geeichten Meßzylinder (siehe Liste) aufgefangen, wobei den entnommenen Proben entsprechende Flüssigkeitsmengen mit Aqua destillata zugefügt wurden, um die fortwährende Überprüfbarkeit zu gewährleisten.

Die Verarbeitung der entnommenen Proben zur Bestimmung von Keimzahl und Chemotherapeutikumkonzentration wird unter 2.7.

und 2.8. ausführlich beschrieben.

Jedes einzelne Teilexperiment wurde zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit dreimal ausgeführt. Im einzelnen wurden sowohl die Konzentrationsprofile von Ofloxacin in Serum- als auch in Kantharidinblasenflüssigkeit simuliert, und zwar einerseits bei *Staphylococcus aureus*-Stamm Nr.2057/85 und Stamm-Nr.1347/85 und andererseits bei *Streptococcus pyogenes*-Stamm-Nr.4210/85 und Stamm-Nr.3375/85.

Die pharmakokinetischen Parameter und die für die Versuchsläufe daraus abgeleiteten Kenngrößen seien zur Übersicht in Tabelle 6 noch einmal zusammengefaßt.

Zu Vergleichszwecken wurde jedem dreifach durchgeführten Teilexperiment mit Simulation eines Chemotherapeutikumprofils ein doppelt durchgeführter, identischer Versuchsansatz ohne Chemotherapeutikum beigelegt, um die Unabhängigkeit der Keimzahlverminderung von den dynamischen Versuchsbedingungen zu belegen.

Parameter	Serum- spiegel	CBF- spiegel	
Absorptionskonstante, K_a	2,9	0,325	$[h^{-1}]$
Eliminationskonstante, K_e	0,1	0,136	$[h^{-1}]$
Halbwertszeit der Absorption, $T_{1/2a}$	0,24	2,130	$[h]$
Halbwertszeit der Elimination, $T_{1/2e}$	7,0	5,080	$[h]$
S.aureus-spezifische Daten			
Flußrate, F	30,0	30,00	$[ml/h]$
Volumen Kulturgefäß, V_A	300,0	220,58	$[ml]$
Volumen Chemtherap.-Gefäß, V_B	10,34	92,30	$[ml]$
Modellversuchsdosis, D	1,71	1,91	$[mg]$
S.pyogenes-spezifische Daten			
Flußrate, F	50,00	50,00	$[ml/h]$
Volumen Kulturgefäß, V_A	500,00	367,64	$[ml]$
Volumen Chemtherap.-Gefäß, V_B	17,24	153,80	$[ml]$
Modellversuchsdosis, D	2,85	3,19	$[mg]$

Tab. 6: Versuchsrelevante Pharmakokinetikdaten und daraus abgeleitete experimentelle Größen

2.7. Keimzahlbestimmung

Zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten (d. h. bei Versuchsbeginn und danach in stündlichen Abständen) wurde in einem Reagenzglas die aus dem Kulturgefäß A kommende Flüssigkeit (Bakteriensuspension) ca. 2 Minuten lang aufgefangen (Untersuchungszeitpunkt $\pm$ 1 Minute), um eine Probenflüssigkeit von ca. 1 ml zu erhalten. Außerdem mußte im Auffangmeßzylinder die entsprechende Menge Aqua dest. nachgefüllt werden, um die Kontrolle über die Kontinuität der Fördermenge der peristaltischen Pumpe zu gewährleisten.

Um geeignete Verdünnungsreihen herstellen zu können, wurden vor Versuchsbeginn 1,8 ml der auch im Hauptversuch verwendeten Bouillon (tryptische Sojabouillon) in Reagenzgläser pipettiert und mit aluminiumbeschichteten Stopfen so verschlossen, daß der während der Sterilisation auftretende Flüssigkeitsverlust vernachlässigbar klein gehalten werden konnte.

Von der aus dem ableitenden Glasröhrchen gewonnen Probenflüssigkeit wurden nun 0,2 ml mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette (siehe Liste 2.6.5.) in ein sterilisiertes, mit 1,8 ml Flüssigmedium gefülltes Reagenzglas, eingebracht und maschinell durchmischt (Rüttler, siehe Liste 2.6.5.). Von dieser 1 : 10 Verdünnung der ursprünglichen Keimdichte der entnommenen Probe wurden nun mit neuer Pipettenspitze wiederum 0,2 ml entnommen und in das nächste Reagenzglas gegeben. Die Anzahl der durchgeführten Verdünnungsschritte wurde so ausgerichtet, daß bei der später folgenden Auswertung die Keimzahl im zweistelligen Bereich lag.

Um die Ungenauigkeiten der Verdünnungsreihe möglichst gering zu halten und eventuellen Verfälschungen durch Verunreinigungen aus dem Weg zu gehen, wurde für jede Keimzahlbestimmung die Verdünnungsreihe doppelt angelegt. Die beiden jeweils letzten Konzentrationsstufen wurden dabei von einander ge-

trennt in ein Filtergerät (siehe Liste 2.6.5.) gegossen, das mit Unterdruck (erzeugt durch eine Wasserstrahlpumpe) die eingebrachte Bakteriensuspension durch Filterpapierscheiben (siehe Liste 2.6.5.) saugte. Die Porengröße dieser Filter war dabei so bemessen, daß die Bakterien auf der Oberfläche des Filterpapiers festgehalten wurden. Um sicherzustellen, daß alle Bakterien von der Filterwand abgeschwemmt worden waren, wurde der Filtrationsvorgang noch zweimal mit sterilem Flüssigmedium wiederholt (Nachschüttreagenzgläser mit Aluverschluß). Dann wurde das Filtergerät geöffnet, und die Filterpapierscheibe unter sterilen Bedingungen entfernt und auf Columbia-Agar (BBL, Microbiology-Systems, Cockeysville, Md., USA) mit 5 % Hammelblut aufgebracht. Anschließend wurden die Nährböden für 24 Stunden im Brutschrank (siehe Liste 2.6.5.) bei 37°C inkubiert.

Die Bewertung, d. h. die quantitative Erfassung der auf den Filterpapierscheiben gewachsenen Bakterien, erfolgte unter Zuhilfenahme eines mechanisierten Zählgerätes (siehe Liste 2.6.5.). Dabei stellen die verwendeten Rasterfilter einen großen Vorteil dar, da sie das systematische Vorgehen während der Zählung wesentlich erleichterten. Abschließend mußte jeder gefundene Zahlenwert mit dem auf der Petrischale notierten Verdünnungsfaktor multipliziert werden, um die ursprüngliche Bakteriendichte der Probe bestimmen zu können.

Da durch die doppelt angelegten Verdünnungsreihen und die Auswertung der beiden jeweils letzten Konzentrationsstufen somit für jeden einzelnen Meßzeitpunkt vier Keimzählungen durchgeführt wurden, stellten die graphisch gezeigten Ergebnisse in jedem Punkt das Mittel der so gewonnen Einzeldaten dar.

2.8. Chemotherapeutikumspiegelbestimmung für die gesamte Versuchsreihe

Die Ofloxacinspiegel in Serum- und Kantharidinblasenflüssigkeit wurden in einem modifizierten mikrobiologischen Test der Herstellerfirma ermittelt (Microbiological Assay of HOE 280 in Serum, Urine and Saliva, Hoechst AG, Pharma Research Departement, Chemotherapy Departement, Microbiological Laboratories, Dr. N. Knesel, Frankfurt-Hoechst, D).

Dazu wurden die Proben zur Bestimmung der Chemotherapeutikumkonzentration, ebenso wie die unter 2.7) beschriebenen Proben zur Keimzahlbestimmung, in einem Reagenzglas aufgefangen und im Auffangmeßzylinder die entsprechende Menge Flüssigkeit nachgefüllt. Im Unterschied zur Keimzahlbestimmung war für diese Untersuchung eine größere Menge Probenflüssigkeit (ca. 2 ml) notwendig. Anschließend wurden die zu untersuchenden Proben in eine sterile Einmalspritze aufgezogen (siehe Liste 2.6.5.) und durch einen Mikrofilter (siehe Liste 2.6.5.) von den darin vorhandenen Bakterien befreit. Danach wurden die Proben sofort bei -20°C eingefroren.

Nach Durchführung der gesamten Versuchsreihe wurden alle Proben bestimmt. Als Teststamm stand Klebsiella Spezies 1082 E (Hoechst AG, Frankfurt-Hoechst, D) zur Verfügung, der alle 48 Stunden auf Endoagarplatten (Biologische Arbeitsgemeinschaft GmbH, Lich, D) mit 1 % basischem Fuchsin subkultiviert wurde. Vor Beginn der Chemotherapeutikumspiegelbestimmung wurde Klebsiella Spezies 1082 E in Flüssigmedium überimpft und 24 Stunden lang bei 37°C inkubiert.

Als erster Schritt erfolgte die Herstellung der chemotherapeutischen Standardlösungen. Ofloxacin wurde, wie bereits unter 2.6.6. beschrieben, aufgelöst. Als Stammlösung wurde eine Ofloxacinkonzentration von 10 mg/l hergestellt, aus der die Standardkonzentrationen durch eine Verdünnungsreihe im Verhältnis 1 : 2 gewonnen wurden (5 mg/l, 2,5 mg/l, 1,25

mg/l, 0,625 mg/l, 0,313 mg/l).

Das Testmedium bestand aus Mueller-Hinton-Agar-Platten (BBL, Microbiology Systems, Cockeysville, Md., USA) mit einem durchschnittlichen pH-Wert von 7,4.

Zur Herstellung einer Testplatte (rechteckig, Innenmaße 26,3 x 15,6 cm) wurde nun 1 ml der Flüssigkultur von *Klebsiella* Spezies 1082 E im Verhältnis 1 : 10 verdünnt und zusammen mit 90 ml auf 50 - 55°C abgekühltem Testmedium in die Platte gegossen. Nach dem Erhärten des Testmediums in absolut horizontaler Position (um die gleichmäßige Verteilung des Mediums auf der gesamten Platte zu gewährleisten), wurden Löcher mit 4 mm Durchmesser aus dem Agar gestanzt, in die jeweils 0,01 ml der Standardkonzentration oder der zu bestimmenden, unbekannten Probe pipettiert wurden. Dabei wurde ein immer gleiches Schema (3 Reihen à 7 Löcher) angewendet, das erlaubte, auf jeder Testplatte die fünf Standardlösungen und die 12 bzw. 14 Chemotherapeutikumpuben eines Hauptversuches aufzutragen.

Zwei Standardkonzentrationen, die im Bereich der vorwiegend zu erwartenden Ofloxacinkonzentrationen lagen, wurden doppelt aufgetragen (jeweils an den entgegengesetzten Löchern einer Testplatte, um bei eventuellen Differenzen der Agar-Schichtdicke einen Mittelwert bilden zu können). Nach einer Vordiffusionszeit von 18 Stunden wurden die Testplatten für weitere 8 Stunden bei 37°C inkubiert. Zur Auswertung erfolgte eine sorgfältige Messung der aufgetretenen Hemmhofdurchmesser, die Ablesung geschah mittels Schublehre auf 0,5 mm Genauigkeit.

Da bei diesem Test die Hemmzone proportional dem Logarithmus der Konzentration war, wurden die gefundenen Durchmesser der Standardlösungen auf halblogarithmisches Millimeterpapier gegen die Ofloxacinkonzentration aufgetragen, um somit Standardgeraden zur Bestimmung der unbekannten Proben zur Verfügung zu haben (Abb. 14).

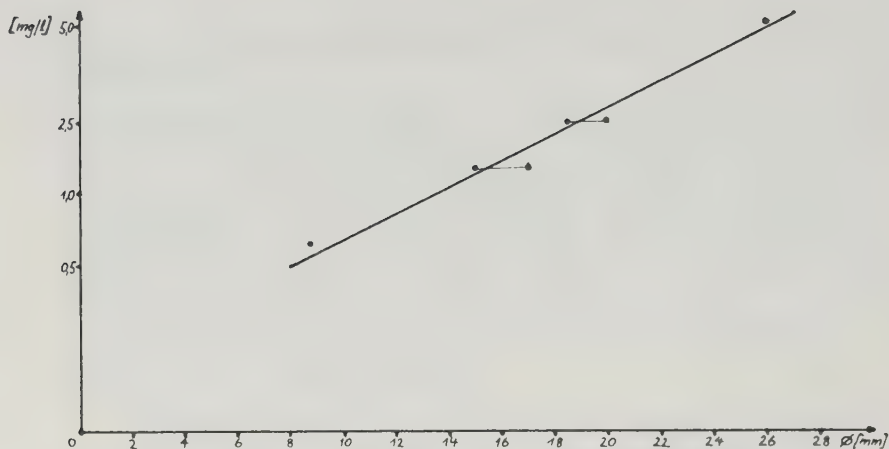


Abb. 14: Darstellung der Hemmhofdurchmesser von Ofloxacin in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration (Standardgerade)

Dabei wurde für jede Testplatte eine eigene Standardgerade konstruiert. Bei der Ablesung des Hemmhofdurchmessers der 0,313 mg/l-Standardlösung ergaben sich größere Differenzen, so daß im allgemeinen dieser Wert bei der Konstruktion der Standardgeraden nicht berücksichtigt wurde, da, wie die Tabellen 7 und 8 zeigen, die Berechnung der aufgrund von Probanden-Daten ermittelten Ofloxacin-Konzentration in Plasma- bzw. Kantharidinblasenflüssigkeit in der Zeit als kleinste getestete Konzentration 2,68 bzw. 1,41 mg/l ergeben hatten, und somit dieser Wert außerhalb des Schwankungsbereichs der getesteten Profile lag.

Proben-nr.	Entnahmezeit der Probe	t-t _{lag}	$e^{-K_e \cdot (t-t_{lag})}$ = x	$e^{-K_a \cdot (t-t_{lag})}$ = y	A · [x-y]
	[min]	[h]	-	-	[mg/l]
1	15	0,25	0,975	0,484	2,90
2	30	0,50	0,951	0,234	4,23
3	45	0,75	0,928	0,114	4,80
4	60	1,00	0,905	0,055	5,02
5	75	1,25	0,882	0,027	5,04
6	90	1,50	0,861	0,013	5,00
7	105	1,75	0,839	0,006	4,91
8	135	2,25	0,798	0,001	4,70
9	195	3,25	0,722	0	4,26
10	255	4,25	0,654	0	3,86
11	315	5,25	0,591	0	3,49
12	375	6,25	0,535	0	3,16
13	435	7,25	0,484	0	2,85
14	475	7,90	0,454	0	2,68

Tab. 7: Berechnung der aufgrund von Probanden-Daten ermittelten Ofloxacin-Konzentration in Serumflüssigkeit in der Zeit

Proben-nr.	Entnahmezeit der Probe	t-t _{lag}	$e^{-K_e \cdot (t-t_{lag})}$ = x	$e^{-K_a \cdot (t-t_{lag})}$ = y	A · [x-y]
	[min]	[h]	-	-	[mg/l]
1	15	0	0	0	0
2	55	0,56	0,926	0,832	1,41
3	95	1,26	0,841	0,662	2,68
4	135	1,91	0,770	0,536	3,51
5	175	2,56	0,705	0,434	4,06
6	215	3,26	0,641	0,346	4,42
7	255	3,91	0,587	0,280	4,60
8	295	4,56	0,537	0,226	4,66
9	335	5,26	0,488	0,180	4,61
10	375	5,91	0,447	0,146	4,51
11	425	6,76	0,398	0,110	4,31
12	475	7,56	0,357	0,085	4,07

Tab. 8: Berechnung der aufgrund von Probanden-Daten ermittelten Ofloxacin-Konzentration in Kantharidinblasenflüssigkeit in der Zeit

3. Ergebnisse

3.1. Wachstum der eingesetzten Bakterienstämme im Flüssigmedium

Die vorliegenden Versuchsbedingungen (stete Verdünnung der eingesetzten Bakterienstämme durch die zugeführte tryptische Sojabouillon im zentralen Kulturgefäß A etc.) führten zu einer regelmäßig guten Vermehrung der verschiedenen *S.aureus*- und *S.pyogenes*-Hautisolate.

3.1.1. Wachstum der Staphylococcus aureus-Hautisolate

Zu Vergleichszwecken wurde jedem dreifach durchgeführten Teilerperiment mit Simulation eines Chemotherapeutikumprofils ein doppelt durchgeführter, identisch aufgebauter Versuchsan-satz ohne Wirkstoff zur Seite gestellt, d. h. in diesem Fall unterblieb die Einwaage der Modellversuchsdosis D in das Chemotherapeutikumgefäß B.

So kam es in tryptischer Sojabouillon während des Untersuchungszeitraumes bei Stamm-Nr.2057/85 der *S.aureus*-Hautisolate zu einer Zunahme der Keimdichte auf etwa das 87,4-fache des Ausgangswertes, während bei Stamm-Nr.1347/85 die Keimdichte im gleichen Zeitraum um etwa das 68,2-fache zunahm (Abb. 15).

Kennzeichnend für den Verlauf dieser Zunahme der Bakterien-dichte nach einstündiger, statischer Inkubation im Kulturge-fäß A war bei beiden *S.aureus*-Isolaten die zunächst (0-60 min)noch schwache Vermehrung, die aber im weiteren Verlauf (60 - 300 min) merklich zunahm, um gegen Ende des Versuchs-zeitraumes (300 - 360 min) wieder in eine flachere Wachstums-kurve überzugehen.

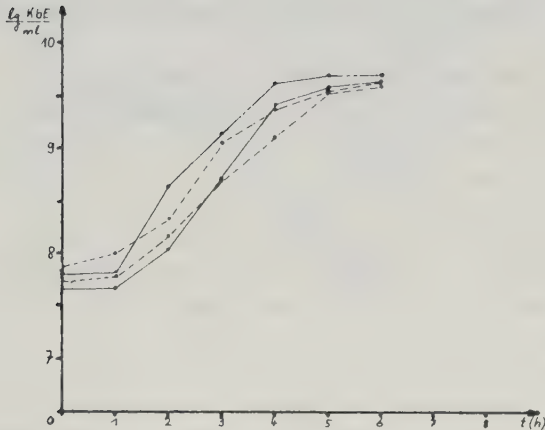


Abb. 15: Wachstum von *S. aureus*-Hautisolaten im Modellversuch ohne Chemotherapeutikumgabe (durchgezogene Linien: Stamm-Nr. 2057/85, gestrichelte Linien: Stamm-Nr. 1347/85)

3.1.2. Wachstum der *Streptococcus pyogenes*-Hautisolate

Auch bei den *S. pyogenes*-Versuchsreihen wurden, wie unter 3.1.1. beschrieben, für jeden Versuchsteil zwei getrennte Parallelversuche ohne Simulation eines Chemotherapeutikums profils durchgeführt, um die Unabhängigkeit der Keimzahlverminderung von den dynamischen Versuchsbedingungen belegen zu können.

In dem verwendeten Flüssigmedium (tryptische Sojabouillon) kam es während des Untersuchungszeitraumes bei Stamm-Nr.-3375/85 der *S. pyogenes*-Hautisolate zu einer Steigerung der Keimdichte auf das 60,1-fache des Ausgangswertes. Nur geringfügig stärker war die Zunahme der Keimdichte bei Stamm-Nr.-4210/85, hier wurde das 62,4-fache der ursprünglichen Bakteriendichte erreicht (Abb. 16).

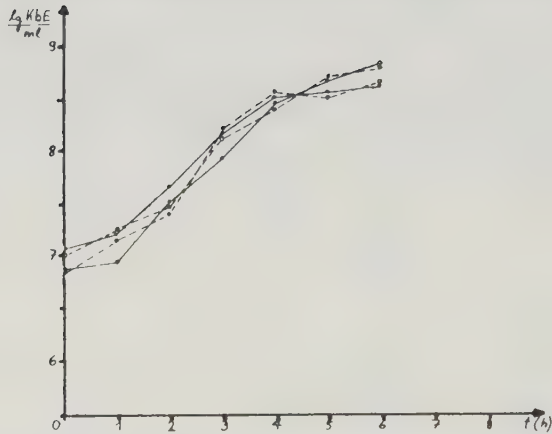


Abb. 16: Wachstum von *S. pyogenes*-Hautisolaten im Modellversuch ohne Chemotherapeutikumzugabe (durchgezogene Linien: Stamm-Nr. 3375/85, gestrichelte Linien: 4210/85)

3.2. Wachstumshemmung bei *Staphylococcus aureus*

Im Gegensatz zu 3.1.1. wurde nun als Chemotherapeutikum Ofloxacin mit der für das jeweilige Wirkstoffprofil notwendigen Dosis dem zentralen Kulturgefäß A zugeführt, was zu einer charakteristischen Wachstumshemmung der zwei untersuchten Isolate dieser Spezies führte.

3.2.1. Entwicklung der S.aureus-Bakteriendichte in Gegenwart des simulierten Serumspeigelsprofils von Ofloxacin

Das Profil der Serumspeigel von Ofloxacin zeigte während des Versuchszeitraumes bei den beiden S.aureus-Stämmen in tryptischer Sojabouillon eine stark bakterizide Wirkung. Obgleich es nicht zum völligen Abtöten dieser Spezies kam, lag die erreichte erhebliche Keimreduktion doch im Bereich von 4,36-5,36 Zehnerpotenzen (Abb. 17 und 19). Als Ergebnis der Chemotherapeutikumspeigelbestimmung (siehe 2.8.) zeigen die Abb. 18 und 20 die für die oben genannten Versuchsreihen ermittelten Konzentrationsprofile. Um zu verdeutlichen, in wie weit die dynamischen Bedingungen dieser Simulationsversuche das richtige Konzentrationszeitprofil erbracht hatten, zeigt die gestrichelte Linie in den Abb. 18 und 20 die auf mathematischer Basis (siehe 2.6.2.) aus den Probandendaten abgeleitete Idealkurve des Profilverlaufes.

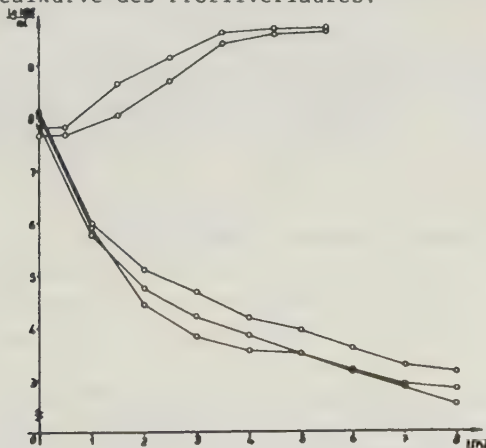


Abb. 17: Entwicklung der Bakteriendichte (KbE = koloniebildende Einheiten) in Gegenwart des Ofloxacin-Serumspeigelsprofils bei S.aureus-Stamm-Nr.2057/85 im dreifachen Versuchsansatz (zum Vergleich: die beiden oberen Kurven geben die Entwicklung der Keimdichte in Abwesenheit von Ofloxacin wieder)

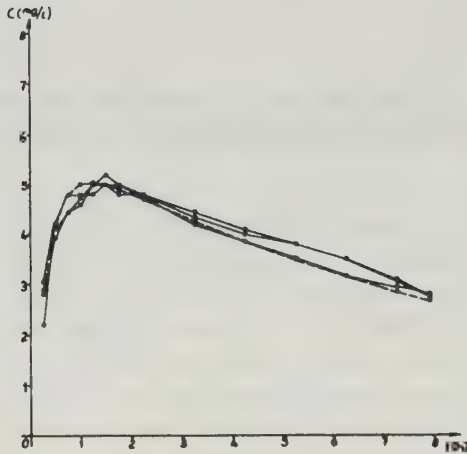


Abb. 18: Tatsächlich erreichte Konzentrations-Zeit-Profile von Ofloxacin im dreifachen Serumspiegel-Simulationsversuch bei *S.aureus*-Stamm-Nr. 2057/85 (die gestrichelte Kurve gibt die auf mathematischer Basis aus den klinischen Probandendaten abgeleitete Ideal-kurve wieder)

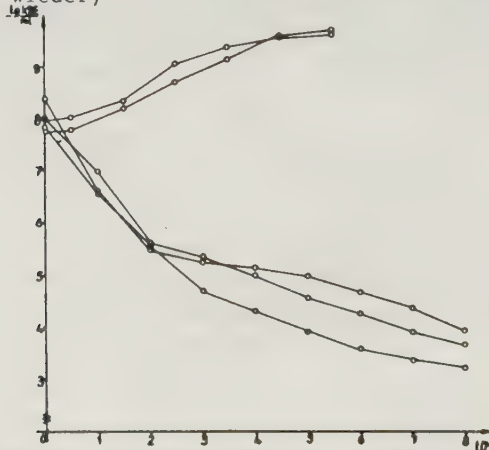


Abb. 19: Entwicklung der Bakteriendichte (KbE = koloniebildende Einheiten) in Gegenwart des Ofloxacin-Serumspiegelprofils bei *S.aureus*-Stamm-Nr. 1347/85 im dreifachen Versuchsansatz (zum Vergleich: die beiden oberen Kurven geben die Entwicklung der Keimdichte in Abwesenheit von Ofloxacin wieder)

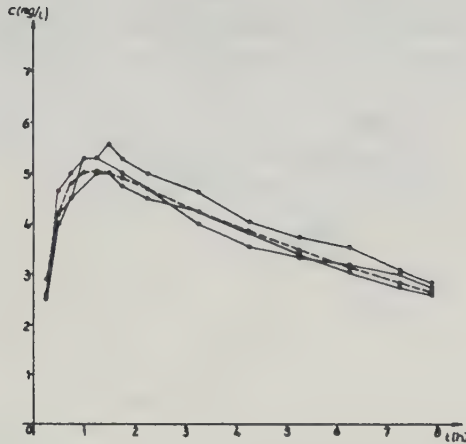


Abb. 20: Tatsächlich erreichte Konzentrations-Zeit-Profile von Ofloxacin im dreifachen Serumspeigel-Simulationsversuch bei *S.aureus*-Stamm-Nr.1347/85 (die gestrichelte Kurve gibt die auf mathematischer Basis aus den klinischen Probandendaten abgeleitete Ideal-kurve wieder)

3.2.2. Entwicklung der *S.aureus*-Bakteriendichte in Gegenwart des simulierten Kantharidinblasenflüssigkeits(CBF)-Spiegelprofils von Ofloxacin

Das Profil der Kantharidinblasenflüssigkeitsspiegel von Ofloxacin erreichte bei beiden *S.aureus*-Stämmen in tryptischer Sojabouillon eine gute bakterizide Wirkung, wenngleich es merklich schwächer ausgeprägt war als beim Serumspeigelprofil. In dieser für die Wirksamkeit im Gewebe resp. Haut stehenden Simulation fiel die Bakterienzahl um 4,11 - 4,76 Zehnerpotenzen (Abb. 21 und 23), wobei die gerade anfangs schwache Keimreduktion profilspezifisch bedingt sein könnte. Auch hier wurden als Ergebnisse der Chemotherapeutikum-Spiegelbestimmung (siehe 2.8.) der CBF-Konzentrations-Zeit-Profile (Abb. 22 und 24) den zugehörigen Entwicklungen der Bakteriendichte zugeordnet, dabei wurde auch bei dieser

Auswertung in den Abb. 22 und 24 eine gestrichelte Linie zur Verdeutlichung der Konzentrations-Idealkurve (errechnet auf mathematischer Basis) eingezeichnet.

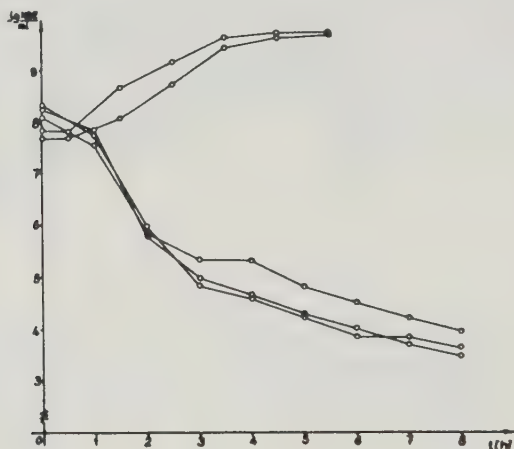


Abb. 21: Entwicklung der Bakteriendichte (KbE = koloniebildende Einheiten) in Gegenwart des Ofloxacin-Kantharidinblasenflüssigkeits(CBF)-Spiegelprofils bei S.aureus-Stamm-Nr.2057/85 im dreifachen Versuchsansatz (zum Vergleich: die beiden oberen Kurven geben die Entwicklung der Keimdichte in Abwesenheit von Ofloxacin wieder)

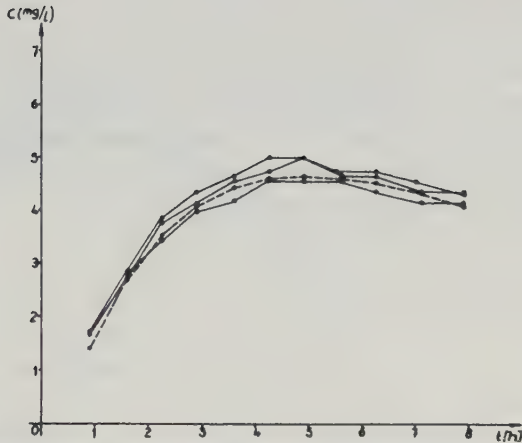


Abb. 22: Tatsächlich erreichte Konzentrations-Zeit-Profile von Ofloxacin im dreifachen CBF-Spiegel-Simulationsversuch bei *S. aureus*-Stamm-Nr. 2057/85 (die gestrichelte Kurve gibt die auf mathematischer Basis aus dem klinischen Probandendaten abgeleitete Idealkurve wieder)

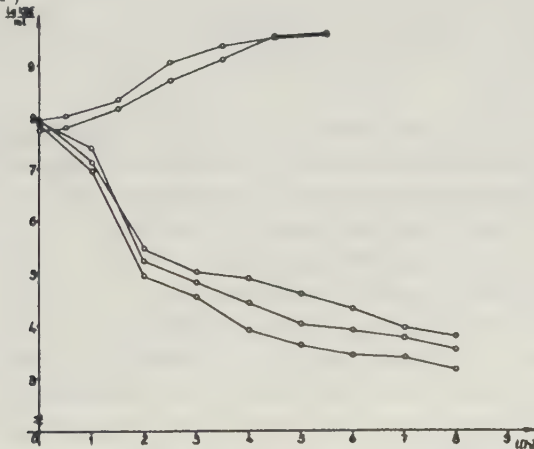


Abb. 23: Entwicklung der Bakteriendichte (KbE = koloniebildende Einheiten) in Gegenwart des Ofloxacin-Kantha-ridinblasenflüssigkeits(CBF)-Spiegelprofils bei *S. aureus*-Stamm-Nr. 1347/85 im dreifachen Versuchsansatz (zum Vergleich: die beiden oberen Kurven geben die Entwicklung der Keimdichte in Abwesenheit von Ofloxacin wieder)

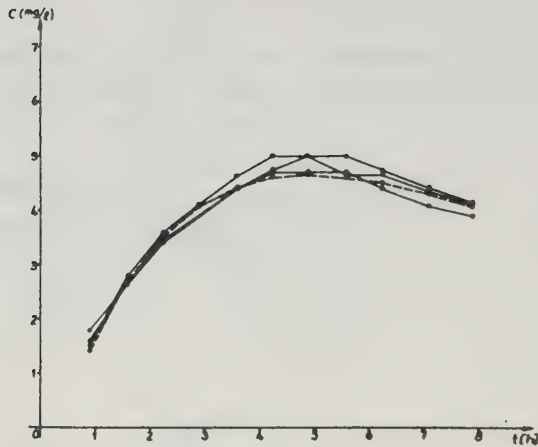


Abb. 24: Tatsächlich erreichte Konzentrations-Zeit-Profile von Ofloxacin im dreifachen CBF-Spiegel-Simulationsversuch bei *S.aureus*-Stamm-Nr.1347/85 (die gestrichelte Kurve gibt die auf mathematischer Basis aus den klinischen Probandendaten abgeleitete Idealkurve wieder)

3.2.3. Bakterizidieparameter der In-vitro-Simulation bei *S.aureus*

Sowohl in Gegenwart des Ofloxacin-Serumspiegelprofils als auch in Gegenwart des entsprechenden Kantharidinblasenflüssigkeitsspiegelprofils kam es bei beiden *S.aureus*-Stämmen zu einer Reduktion der Keimdichte um etwa 4 - 5 Zehnerpotenzen. Dies fand seinen Niederschlag in verschiedenen von Shah angegebenen Bakterizidieparametern (106, 107, 109): im K_N -Wert, der die maximale Keimreduktion des Ausgangswertes in Prozent wiedergibt (mit der zugehörigen Zeit t : dem Zeitpunkt, bei dem die maximale Keimreduktion erreicht wurde), und im $t_{99\%}$ -Wert, der die Zeit bezeichnet, die für eine Keimreduktion um 99 Prozent des Ausgangswertes benötigt wurde. Diese beiden Parameter umschreiben den bakteriziden Effekt des verwendeten Chemotherapeutikums also zahlenmäßig.

In diesem Fall ergab sich bei Stamm-Nr.2057/85 für den dreifachen Serumspiegelansatz ein besonders niedrigen K_n -Wert von durchschnittlich 0,0007 Prozent, der bei allen Versuchen infolge der kontinuierlichen Keimreduktion erst zu Versuchsende ($t = .480$ min) erreicht wurde. Als besonders stark erwies sich der bakterizide Effekt in den ersten Stunden, also in der Periode der Invasion, bzw. der beginnenden Evasion des Chemotherapeutikums, was sich im $t_{99\%}$ -Wert ausdrückte, der bei diesem Stamm das Minimum aller Versuchsreihen erreichte, er betrug hier durchschnittlich 56 min. Der schon bei der MHK-Bestimmung eine Verdünnungsstufe höher liegende Stamm-Nr.1347/85 erwies sich geringfügig unempfindlicher: durchschnittlicher K_n -Wert war 0,0034 Prozent und durchschnittlicher $t_{99\%}$ -Wert 86 min. Bezüglich der genauen Einzeldaten sei auf Tabelle 9 verwiesen.

Insgesamt gingen vom Gewebsspiegelprofil merklich schwächere bakterizide Effekte als vom Serumspiegelprofil aus, was im höheren K_n -Wert (durchschnittlich 0,0038 Prozent für Stamm-Nr.2057/85, bzw. 0,0047 für Stamm-Nr.1347/85) deutlich erkennbar wurde (t für K_n : 480 min). Insbesondere in der ersten Stunde nahm die Staphylokokkendichte in Gegenwart des Gewebsspiegelprofils deutlich langsamer ab, was sich in der Erhöhung des $t_{99\%}$ -Wertes gegenüber dem Serumspiegelversuch zeigte. Er betrug für Stamm-Nr.2057/85 im Durchschnitt der drei Versuche 108 min, bei Stamm-Nr.1347/85 99min (Einzeldaten in Tabelle 9). Auch im Gewebsspiegelansatz war bei dem zufolge der MHK-Bestimmung etwas empfindlicheren Stamm der bakterizide Effekt ein wenig stärker ausgeprägt.

MHK		Serumspiegel			Gewebsspiegel		
	[mg/l]	t _{99%}	K _n	t	t _{99%}	K _n	t
		[min]	[%]	[min]	[min]	[%]	[min.]
Stamm-Nr.	0,25	57	0,0004	480	111	0,0077	480
2057/85		55	0,0005	480	107	0,0017	480
		58	0,0011	480	107	0,0020	480
Stamm-Nr.	0,5	72	0,0035	480	103	0,0076	480
1347/85		87	0,0024	480	102	0,0044	480
		96	0,0043	480	93	0,0021	480

Tab. 9: Bakterizidieparameter für die in vitro gegenüber dem Konzentrations-Zeit-Profil von Ofloxacin in Serum- und Kantharidinblasenflüssigkeit exponierten *S.aureus*-Hautisolate (Einzeldaten)

3.3. Wachstumshemmung bei Streptococcus pyogenes

Ein weiterer wichtiger Vertreter aus der Reihe der für den Dermatologen interessanten pathogenen Keime ist *Streptococcus pyogenes*. Nach den unter 3.1.2. aufgeführten Wachstumsversuchen ohne Wirkstoffeinsatz wurde deshalb in weiteren Versuchsreihen die Wachstumshemmung der verschiedenen Ofloxacin-Profile an zwei Hautisolaten dieser Spezies untersucht.

3.3.1. Entwicklung der *S.pyogenes*-Bakteriendichte in Gegenwart der simulierten Serumspiegelprofile von Ofloxacin

Bei beiden *Streptococcus pyogenes*-Stämmen zeigte das Profil der Serumspiegel von Ofloxacin in tryptischer Sojabouillon einen deutlichen bakteriziden Effekt, was eine entscheidende Erweiterung des Wirkungsspektrums dieses Chemotherapeutikums gegenüber früheren Vertretern dieser Substanzklasse dar-

stellt. Die erreichte Keimreduktion lag bei dem im Agardilutionstest empfindlicheren Stamm-Nr.3375/85 im Bereich von 2,31 - 3,02 Zehnerpotenzen, während sie bei Stamm-Nr.4210/85 nur in einen Bereich von 2,01 - 2,33 Zehnerpotenzen gelangte (Abb. 25 und 27).

Für die oben genannten Versuchsreihen wurden als Ergebnis der Chemotherapeutikumspiegelbestimmung (siehe 2.8) die zugehörigen Konzentrations-Zeit-Profile jeweils unter den Entwicklungen der Bakteriendichte dargestellt (Abb. 26 und 28). Dabei wurde durch die gestrichelte Linie in den Abbildungen 26 und 28 die Näherung der im dynamischen Modell tatsächlich simulierten Serumprofile an eine anhand der Probandendaten auf mathematischer Basis abgeleitete Idealkurve des Konzentrationsverlaufes vor Augen geführt.

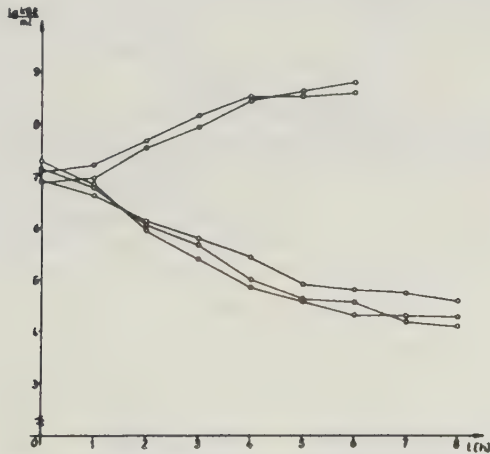


Abb. 25: Entwicklung der Bakteriendichte (KBE = koloniebildende Einheiten) in Gegenwart des Ofloxacin-Serumspiegelprofils bei *S.pyogenes*-Stamm-Nr.3375/85 im dreifachen Versuchsansatz (zum Vergleich: die beiden oberen Kurven geben die Entwicklung der Keimdichte in Abwesenheit von Ofloxacin wieder)

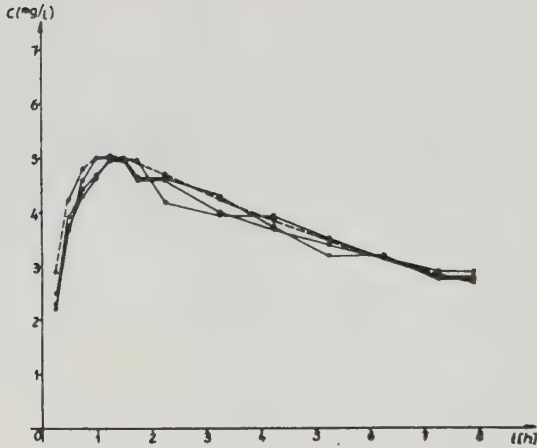


Abb. 26: Tatsächlich erreichte Konzentrations-Zeit-Profile von Ofloxacin im dreifachen Serumspiegel-Simulationsversuch bei *S.pyogenes*-Stamm-Nr.3375/85 (die gestrichelte Kurve gibt die auf mathematischer Basis aus den klinischen Probandendaten abgeleitete Ideal-kurve wieder)

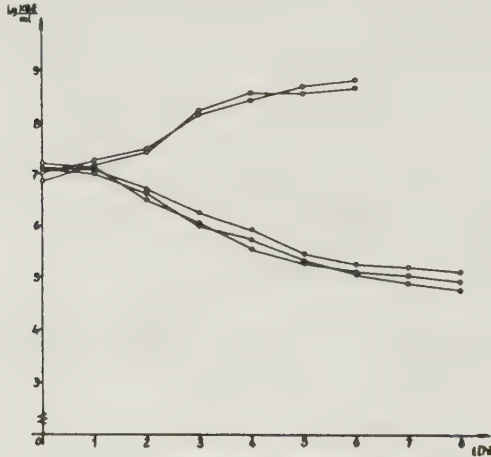


Abb. 27: Entwicklung der Bakteriendichte (KbE = koloniebildende Einheiten) in Gegenwart des Ofloxacin-Serumspiegelprofils bei *S.pyogenes*-Stamm-Nr.4210/85 im dreifachen Versuchsansatz (zum Vergleich: die beiden oberen Kurven geben die Entwicklung der Keimdichte in Abwesenheit von Ofloxacin wieder)

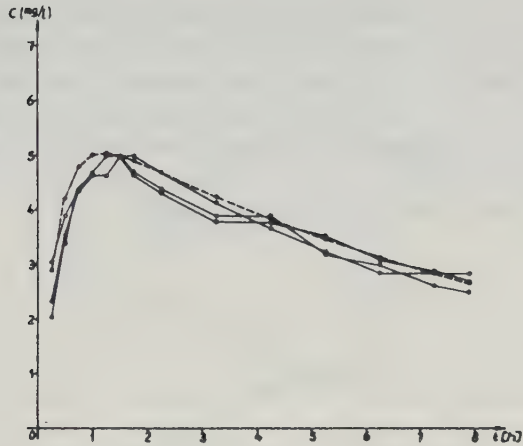


Abb. 28: Tatsächlich erreichte Konzentrations-Zeit-Profile von Ofloxacin im dreifachen Serumspiegel-Simulationsversuch bei *S.pyogenes*-Stamm-Nr.4210/85 (die gestrichelte Kurve gibt die auf mathematischer Basis aus den klinischen Probandendaten abgeleitete Idealkurve wieder)

3.3.2. Entwicklung der *S.pyogenes*-Bakteriendichte in Gegenwart des simulierten Kantharidinblasenflüssigkeits-(CBF)-Spiegelprofils von Ofloxacin

Bei beiden *S.pyogenes*-Stämmen erreichte das Profil der Kantharidinblasenflüssigkeitspiegel von Ofloxacin in tryptischer Sojabouillon eine deutliche bakterizide Wirkung, die in etwa mit der Wirkung des Serumspiegelprofils gleichzusetzen war. So fiel hier die Bakterienzahl in dieser, für die Wirksamkeit im Gewebe resp. Haut stehenden Simulation innerhalb 8 Stunden um 2,04 - 2,98 Zehnerpotenzen (Abb. 29 und 31), zum Vergleich, beim Serumspiegel lag dieser Wert bei 2,01 - 3,02 Zehnerpotenzen, sodaß sich im Gegensatz zur *S.aureus*-Versuchsreihe kaum profilspezifische Unterschiede zwischen Serum- und Gewebsprofil ergaben. Wie schon bei allen anderen Teilexperimenten, so wurde auch diese letzte Teilstudie der

Bakterienentwicklungen im dynamischen Modell durch die Ergebnisse der Chemotherapeutikumspiegelbestimmung (siehe 2.8.) ergänzt. Die Abbildungen 30 und 32 zeigen die CBF-Konzentrations-Zeit-Profile der oben genannten Keimdichteentwicklungen, wobei die dort eingezeichnete gestrichelte Linie wiederum die aufgrund von Probandendaten mathematisch erfaßte Idealkurve der Konzentrationsverteilung bei der einmaligen Gabe des Chemotherapeutikums wiedergibt.

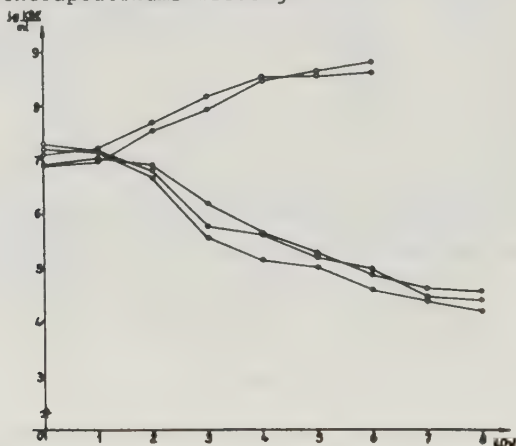


Abb. 29: Entwicklung der Bakteriendichte (KbE = koloniebildende Einheiten) in Gegenwart des Ofloxacin-Kantharidinblasenflüssigkeits(CBF)-Spiegelprofils bei *S.pyogenes*-Stamm-Nr.3375/85 im dreifachen Versuchsansatz (zum Vergleich: die beiden oberen Kurven geben die Entwicklung der Keimdichte in Abwesenheit von Ofloxacin wieder)

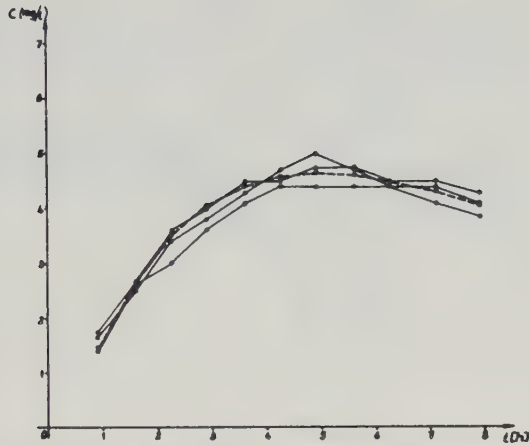


Abb. 30: Tatsächlich erreichte Konzentrations-Zeit-Profile von Ofloxacin im dreifachen CBF-Spiegel-Simulationsversuch bei *S.pyogenes*-Stamm-Nr.3375/85 (die gestrichelte Kurve gibt die auf mathematischer Basis aus den klinischen Probandendaten abgeleitete Idealkurve wieder)

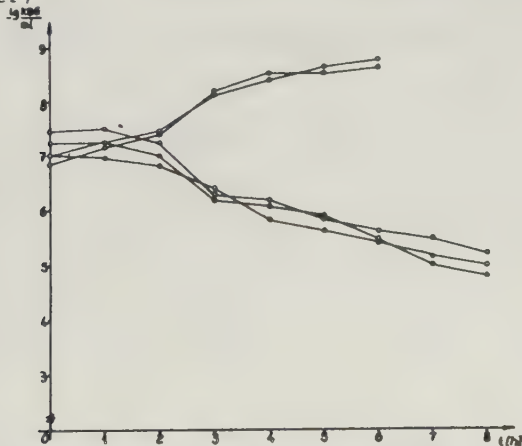


Abb. 31: Entwicklung der Bakteriendichte (KbE = koloniebildende Einheiten) in Gegenwart des Ofloxacin-Kantharidinblasenflüssigkeits(CBF)-Spiegelprofils bei *S.pyogenes*-Stamm-Nr.4210/85 im dreifachen Versuchsansatz (zum Vergleich: die beiden oberen Kurven geben die Entwicklung der Keimdichte in Abwesenheit von Ofloxacin wieder)

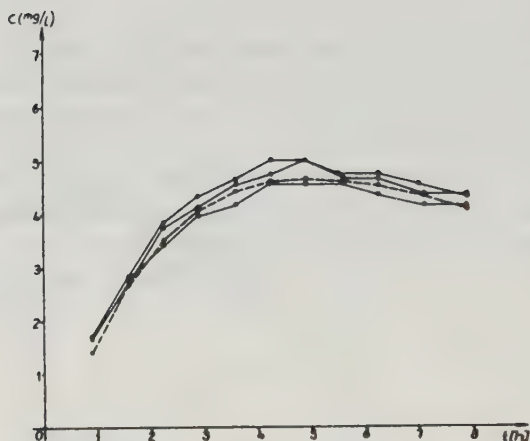


Abb. 32: Tatsächlich erreichte Konzentrations-Zeit-Profile von Ofloxacin im dreifachen CBF-Spiegel-Simulationsversuch bei *S.pyogenes*-Stamm-Nr.4210/85 (die gestrichelte Kurve gibt die auf mathematischer Basis aus den klinischen Probandendaten abgeleitete Idealkurve wieder)

3.3.3. Bakterizidieparameter der In-vitro-Simulation bei *S.pyogenes*

Bei den beiden *S.pyogenes*-Stämmen der Gruppe A nach Lancefield zeigte sich sowohl in Gegenwart des Ofloxacin-Serumspiegelprofils als auch in Gegenwart des entsprechenden Kantharidinblasenflüssigkeitsspiegelprofils ein deutlicher bakterizider Effekt, der trotz der verschiedenen Kurvenverläufe der Serum- und Gewebsspiegel keine augenfälligen Unterschiede aufwies. Binnen acht Stunden verminderte sich die Keimdichte bei Stamm-Nr.3375/85 bei beiden Profilen um durchschnittlich 2,74 bzw. 2,78 Zehnerpotenzen, während bei dem etwas unempfindlicheren Stamm-Nr.4210/85 die beiden Werte (2,22 bzw. 2,21 Zehnerpotenzen) fast identisch waren. Dabei übertrafen interessanterweise bei beiden Stämmen die durch das CBF-Profil erreichten Keimreduktionen geringfügig die des

Serumprofils, ganz im Gegensatz zur ersten Versuchsreihe mit *S.aureus*.

Mit den schon unter 3.2.3. näher beschriebenen Bakterizidieparametern (K_N -Wert mit zugehöriger Zeit t und $t_{99\%}$ -Wert) wurde der bakterizide Effekt des verwendeten Chemotherapeutikums auch dieser Spezies gekennzeichnet. So ergab sich bei Stamm-Nr.3375/85 für den dreifachen Serumspiegelansatz ein durchschnittlicher K_N -Wert von 0,22 Prozent, der bei allen Versuchen der *S.pyogenes*-Serum- wie Gewebsspiegelreihe infolge der kontinuierlichen Keimreduktion erst zu Versuchsende ($t = 480$ min) erreicht wurde.

Ebenso wie in der *S.aureus*-Versuchsreihe, konnte auch bei *S.pyogenes* ein in den ersten Stunden (Phase der Invasion, bzw. der beginnenden Evasion) etwas gesteigerter bakterizider Effekt beobachtet werden, doch blieb diese Erscheinung eher diskret, erkennbar am $t_{99\%}$ -Wert, der beim oben genannten Stamm für das Serumspiegelprofil zwar den niedrigsten Wert dieser Versuchsreihe erreichte ($t_{99\%}$ beträgt hier durchschnittlich 243 min), aber gegenüber den *S.aureus*-Versuchen doch deutlich verlängert war. Der schon bei der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration gegenüber Ofloxacin eine Verdünnungsstufe geringer empfindliche Stamm-Nr.4210/85 (MHK: 2 mg/l) zeigte sich widerstandsfähiger, und zwar deutlicher als zu erwarten war, was an den höheren Bakterizidieparametern objektiviert werden konnte: durchschnittlicher K_N -Wert 0,65 Prozent, durchschnittlicher $t_{99\%}$ -Wert 383 min. Die Einzeldaten jeder dreifachen Versuchsreihe werden in Tabelle 10 dargestellt.

Ein Unterschied im bakteriziden Effekt zwischen Serum- und Gewebsspiegelprofil ließ sich nicht feststellen, zu diskret fielen hier die Differenzen aus, um daraus eine Aussage treffen zu können. Im Gegensatz zur *S.aureus*-Reihe waren die K_N -Werte der Gewebsspiegel bei *S.pyogenes* gegenüber dem Serumprofil sogar minimal erniedrigt (Stamm-Nr.3375/85: 0,19

Prozent, Stamm-Nr.4210/85: 0,61 Prozent), was für eine, wenn auch nur minimale, stärkere Wirksamkeit des Gewebsspiegelprofils sprechen würde, während sich die $t_{99\%}$ -Werte wieder wie erwartet verhielten. Sie zeigten sich gegenüber dem Serumprofil als leicht erhöht (Stamm-Nr.3375/85 um 42 min auf 285 min, Stamm-Nr.4210/85 um 39 min auf 422 min); die genauen Gewebsspiegel-Bakterizidieparameter sind in Tabelle 10 zu finden.

Deutlich trat noch ein anderer Unterschied zu Tage: sowohl in Gegenwart des Serumspiegelprofils als auch des Gewebespiegelprofils von Ofloxacin zeigte sich bei Stamm-Nr.3375/85, der sich auch mit einer MHK von 1 mg/l als etwas empfindlicher im Agardilutionstest (siehe 2.2.2.) erwiesen hatte, eine erheblich stärkere Keimreduktion als bei Stamm-Nr.4210/85 (MHK: 2 mg/l). Bei Exposition gegenüber Penicillin G wurden bei 10^4 Keimen/Impfstelle keine MHK-Unterschiede festgestellt (siehe 2.2.2.).

	MHK	Serumspiegel		Gewebsspiegel			
		[mg/l]	[min] [%]	[min]	[min] [%]	[min]	[min]
Stamm-Nr. 3375/85	1,0	309	0,49	480	235	0,10	480
		192	0,10	480	285	0,13	480
		229	0,009	480	336	0,34	480
Stamm-Nr.	2,0	475	0,98	480	411	0,54	480
		321	0,51	480	390	0,38	480
		354	0,47	480	465	0,91	480

Tab. 10: Bakterizidieparameter für die in vitro gegenüber dem Konzentrations-Zeit-Profil von Ofloxacin in Serum- und Kantharidinblasenflüssigkeit exponierten S.pyogenes-Hautisolate (Einzeldaten)

4. Diskussion

In der Diskussion soll auf die bei den Versuchen angewandte verbesserte Methode einer In-vitro-Untersuchung eingegangen werden, sowie auf die unterschiedliche Wirksamkeit des getesteten Chemotherapeutikums, sowohl gegenüber den verschiedenen Hautisolaten, wie auch gegenüber den Serum- resp. Gewebespiegeln. Außerdem wird die Notwendigkeit einer Verbreiterung der klinischen Prüfung besprochen.

4.1. Verbesserte Aussagekraft über die klinische Wirksamkeit von Ofloxacin durch den dynamischen Versuchsansatz

Faktoren, welche die antibakterielle Aktivität einer Substanz am jeweiligen Infektionsort beeinflussen, können in vitro routinemäßig nur unvollständig erfaßt werden. Dies trifft u.a. auch für den Konzentrationsverlauf in vivo zu. Eine In-vitro-Analyse des Einflusses dieses Faktors z. B. auf die Bakterizidie eines Chemotherapeutikums setzt genaue Kenntnisse der Pharmakokinetik am Infektionsort voraus, wofür präzise Daten über Serum- und Gewebsspiegel unabdingbare Notwendigkeit darstellen, da die Intensität der therapeutischen und eventuell toxischen Wirkungen eben von der Konzentration des Chemotherapeutikums am Ort des Geschehens abhängt. Dieser Konzentrationszeitverlauf wird von der Chemotherapeutikumdosierung und dem metabolischen Schicksal des Wirkstoffes im Körper bestimmt. Pharmakokinetik ist daher das quantitative Studium von Prozessen der Wirkstoffabsorption und -verteilung, der Biotransformation und der Elimination. Der Gebrauch von mathematischen Modellen, um diese Abläufe zu beschreiben, erlaubt daher Vorhersagen über die Chemotherapeutikum-Konzentration, die eine Funktion der Dosierung, der Applikationsform und der Zeit darstellt, in verschiedenen Teilen des Körpers.

Angesichts der Komplexität des menschlichen Körpers, und der Vielzahl von Wegen, die fremde Substanzen im Körper gehen können, überrascht es nicht, daß umfassende pharmakokinetische Analysen außerordentlich kompliziert sein können und durch mathematische Formulierungen ausgedrückt werden, die den meisten Klinikern unverständlich erscheinen. Glücklicherweise genügen aber meistens relativ einfache pharmakokinetische Betrachtungen für die quantitative Orientierung zu Beginn oder während des klinischen Gebrauchs eines Chemotherapeutikums.

Das Wissen um das pharmakokinetische Verhalten eines Arzneimittels würde den Kliniker befähigen, die Dosierungen so zu wählen, daß die benötigte Anfangskonzentration schnell erzeugt, und dann der gewünschte Konzentrationsbereich am Ort des Geschehens auf gleicher Höhe gehalten werden könnte. Denn die optimale Größe und Häufigkeit einer individuellen Dosierung, wie auch der Zeitverlauf der Akkumulation im Körper während kontinuierlicher Darreichung sind Funktionen des pharmakokinetischen Schicksals eines Chemotherapeutikums (46).

So sind während der letzten Jahre viele analytische Verfahren zu Darstellung von Konzentrationen eines Wirkstoffes oder seiner Metaboliten in Körperflüssigkeiten und Gewebe nach der Verabreichung von therapeutischen Dosen entwickelt worden. Dadurch konnte die Beziehung zwischen Konzentrationen im Körper und der Intensität des pharmakologischen Effekts immer besser verstanden werden. Versuche der vorliegenden Art und Weise tragen deshalb wesentlich zur Effektivität und Sicherheit der Therapie bei. Es ist darum auch für praktizierende Mediziner wichtig, sich mit den Grundprinzipien der Pharmakokinetik auseinanderzusetzen, da derartige Untersuchungen in der klinischen Bakteriologie bereits in gewissem Umfang Eingang gefunden haben (63), und es inzwischen möglicherweise gelungen zu sein scheint, aufgrund von In-vitro-Untersuchun-

gen nach Art der vorliegenden, Voraussagen nicht nur über die Wirksamkeit eines Chemotherapeutikums in der Klinik, sondern auch über seine erforderliche Mindestdosis zu machen (64). Eine therapeutische Relevanz der Befunde wird aber insbesondere für Erreger und Spezies mit MHK-Werten, die nicht wesentlich unterhalb der Maximalspiegel im Serum und im Gewebe liegen (für Quinolone gilt dies z. B. bei Staphylo- und Streptokokken), zu erwarten sein.

Im dynamischen Ansatz dieser Studie bestätigt die In-vitro-Simulation der Serum- bzw. Kantharidinblasenflüssigkeits-Spiegelprofile die von dem statischen Ansatz der MHK-Bestimmung im Agardilutionstest bereits bekannte Tatsache der ausgezeichneten Wirksamkeit von Ofloxacin gegenüber S.aureus-Stämmen (10, 21, 31), unabhängig von deren Penicillinempfindlichkeit und einer guten Wirksamkeit gegenüber S.pyogenes-Stämmen (43, 105, 127). Bei weitgehender Übereinstimmung der MHK-Werte gegenüber den oben genannten Stämmen bestehen zwischen den neuen Quinolonen doch z. T. bemerkenswerte pharmakokinetische Unterschiede bei den Serumhalbwertszeiten [(Ciprofloxacin $t_{1/2e} = 3,9 \pm 0,8h$ (23), Perfloxacin $t_{1/2e} = 8,6 \pm 0,6h$ (78), Norfloxacin $t_{1/2e} = 3,5 - 7,4h$ (54), Ofloxacin $t_{1/2e} = 7,0 \pm 0,3h$ (123)]. Daraus folgt, daß bakterielle Erreger, je nach Art des eingesetzten Quinolons, unterschiedlichen Konzentrationen der Substanz in verschiedenen langen Einwirkungszeiten ausgesetzt sind. Dieses substanzspezifische Charakteristikum kann bei Untersuchungen der vorliegenden Art ebenso berücksichtigt werden wie das dynamische Moment der Zeitverläufe der Konzentration in verschiedenen Kompartementen des Körpers. Ob dabei der Grad der Keimreduktion auch vom Ausgangsinokulum abhängig ist oder dieses vielleicht Einfluß auf das Auftreten von Zellen mit verminderter Empfindlichkeit nimmt, wird in weiteren Versuchen geklärt werden müssen.

4.2. Unterschiedliche Wirksamkeit der simulierten Konzentrationsprofile auf die untersuchten Hautisolate

Die gewählten vier rezenten Isolate aus dem Krankengut der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München gehören zu den häufigsten Erregern von Hauterkrankungen, wobei in der vorliegenden Arbeit zu unterschiedlichen Problemen Stellung genommen werden sollte.

Zum ersten wurden die in ihrer Resistenzentwicklung sehr schnell reagierenden Staphylokokken durch das angewendete Flüssigkeitsmodell in-vivo-ähnlichen Verhältnissen ausgesetzt, wobei über die gesamte Versuchsdauer kein Ansteigen der Erregerzahl festzustellen war. Gerade beim Serumspiegelprofil könnte der Grund hierfür darin liegen, daß die Keimzahl "unter Behandlung" sehr rasch absank, wobei aber nicht alle Keime abgetötet wurden. So wäre es interessant, in weiteren Untersuchungen mit Kulturen der noch vitalen Keime abzuklären, auf Grund welcher Mechanismen diese Keime überlebt hatten.

Es ist ganz sicher sehr wichtig, sich über die Frage der Resistenzentwicklung, Parallelresistenz und hier natürlich über die Mutation etwas ausführlicher Rechenschaft zu geben. Die Untersuchungen zeigen, daß die sogenannten "single-step-Mutanten" mit den verwendeten Konzentrationen wahrscheinlich nicht erreicht werden konnten, da diese ausreichend hoch waren. Nur bei Anwendung von Konzentrationen, die nur sehr geringfügig über der minimalen Hemmkonzentration liegen, bekommt man diese meist nicht sehr wirkungsvollen Mutanten, d. h. die Stämme bleiben immer noch in der Normalverteilung der MHK, der sogenannten empfindlichen Stämme, sie rücken nur ein bis zwei Stufen höher, so daß sie wahrscheinlich bei einer Therapie keine Rolle spielen. Da es aber, z. B. bei *Escherichia coli* drei verschiedene Loci gibt, an denen Resistenz entstehen kann, besteht auch die Möglichkeit, daß alle

drei Mutanten nacheinander entstehen; dann haben wir eine Dreistep-Mutation, d. h. die MHK wird sich in einen Bereich erhöhen, der therapeutische Auswirkungen haben dürfte. Wahrscheinlich sind es eher diese Stämme mit Mehrfach-Mutation, die zu einer effektiven Resistenz führen können. Deshalb werden auf lange Sicht wohl nur bei bestimmten Bakterienstämmen, wie den in besonderem Maße zur Mutation befähigten Staphylokokken, resistente Stämme entstehen können.

Aber auch das Phänomen der Toleranz ist in diesem Zusammenhang anzusprechen. Man muß sich mit dem Gedanken befassen, daß in jeder Bakterienpopulation eine Reihe von Organismen aus irgendwelchen Gründen metabolisch nicht so aktiv sind, d.h. ein bestimmter Bruchteil von Zellen einer Population repliziert während des Konzentrationsverlaufs des Wirkstoffs seine Genome nicht, sondern ruht und macht sich dann als nicht resistenter, aber überlebender Stamm bemerkbar.

Sollte nun im raschen Absinken der Erregerzahl im Makroorganismus ein wichtiges Prinzip zur Verhinderung einer Resistenzentwicklung zu erblicken sein, erscheint es besonders wichtig, daß - mit gewissen Einschränkungen in der ersten Stunde - auch in anderen Geweben als Blut, insbesondere vor allem der Haut, das tatsächlich erreichbare Konzentrationsprofil von Ofloxacin die zur Mutation ja wohl im besonderen Maße befähigten Staphylokokken rasch abtötet. Dabei zeigten die vorliegenden Versuche in anschaulicher Weise die Abnahme des bakteriziden Effekts bei der Simulation des Gewebespiegelprofils im Vergleich zum Profil der Konzentration im Blut, was insbesondere für die Bestimmung der Mindestdosis, gerade im dermatologischen Bereich, von therapeutischem Interesse sein kann. Die Ausprägung der bakteriziden Effekte war bei dem empfindlicheren Stamm der beiden Staphylokokkenisolate insgesamt erwartungsgemäß etwas stärker, doch ließ der multi-resistente andere Stamm, wie aufgrund des Wirkungsmechanismus zu erwarten war, keine Kreuzresistenz zu anderen Antibiotika-

gruppen erkennen, d. h. insbesondere die Bildung von β -Lactamasen sowie Aminoglykosid-inaktivierenden Enzymen war ohne Einfluß auf die antibakterielle Aktivität. Ferner beeinflusst die Übertragung von Resistenzplasmiden die Wirksamkeit der neuen Quinolone in keiner Weise, daher dürfte auch an ihrer therapeutischen Anwendung großes Interesse bestehen.

Zum zweiten wurde auf In-vitro-Untersuchungen neuer Quinolone eingegangen, die, im Unterschied zu den Ergebnissen mit früheren Vertretern dieser Substanzklasse, bei Zugrundelegung des Agardiffusionstestes eine Wirksamkeit auch gegenüber *Streptococcus pyogenes* der Gruppe A nach Lancefield als einen nicht zuletzt dermatologisch relevanten Vertreter dieser Spezies ergeben hatten. Dies gilt in Sonderheit für Ciprofloxacin und Ofloxacin (21, 103, 127). Wenn auch die bakteriziden Effekte der In-vivo-Simulation von Serum - wie auch Gewebsspiegelprofilen deutlich hinter der *S.aureus*-Versuchsreihe zurückblieben, so zeigte sich in jedem Fall eine Keimreduktion auf ca. ein Prozent des Ausgangsinokulums. Prinzipiell gelten für *S.pyogenes* in Hinblick auf die Resistenzsituation die gleichen Überlegungen wie oben ausgeführt, obgleich hier noch günstigere Voraussetzungen vorliegen.

Die beiden *Streptococcus pyogenes*-Isolate erwiesen sich interessanterweise - im Unterschied zu den Staphylokokken- gegenüber dem Serum- und Gewebsspiegelprofil trotz der unterschiedlichen Konzentrationsverläufe als gleich empfindlich, was eventuell einen Hinweis darauf geben könnte, daß bei dieser Spezies weniger eine initiale hohe therapeutische Spitzendosis von Nöten ist, sondern daß die Keimreduktion eher über eine langanhaltende Minimumkonzentration im Blut und damit auch im Gewebe erreicht werden kann. Stärkere Unterschiede im bakteriziden Effekt zeigten sich hier wieder im Unterschied zu *S.aureus* - zwischen den beiden untersuchten Stämmen, obwohl sich bei der Exposition gegenüber Penicillin G kein Unterschied in der minimalen Hemmkon-

zentration gezeigt und sich auch die MHK gegenüber Ofloxacin nur um eine Verdünnungsstufe unterschieden hatte. Dieser Umstand verdeutlicht, daß es gerade in solchen Fällen von großem therapeutischen Interesse sein kann, eine Möglichkeit, wie die in dieser Arbeit aufgezeigte In-vitro-Simulation, an der Hand zu haben, um sich nach Erregerisolation schnell ein Bild über dessen individuelles Verhalten gegenüber dem einzusetzenden Chemotherapeutikum zu machen.

Weiterführende Fragestellungen sind bei dieser Versuchsreihe unbeantwortet geblieben, wie etwa der Einfluß einer Dosisänderung auf die zu erwartende Keimreduktion oder etwa die den tatsächlichen Gegebenheiten besser entsprechende Simulation einer wiederholten Verabreichung des Chemotherapeutikums. Diese Punkte sollten in nachfolgenden Studien bearbeitet werden.

4.3. Verbreiterung der klinischen Prüfung von Ofloxacin gegenüber Staphylo- und Streptokokkeninfektionen

Erste ermutigende Ergebnisse klinischer Prüfungen mit Ofloxacin, die in Japan bei kleineren Kollektiven gewonnen wurden (53, 61, 81, 99, 100, 101, 110, 112, 114, 126), zeigten eine nahezu vollständige Absorption des Chemotherapeutikums aus dem gastrointestinalen Trakt. Der frühe Nachweis von Ofloxacin im Speichel, zusammen mit der gefundenen, hohen Aktivität deutete auf einen schnellen und ungehinderten Transfer in die Peripherie. Diese Annahme unterstützten hohe und langanhaltende Ofloxacin-Konzentrationen bei den oben genannten Studien. In Anbetracht der hohen Wiederfindung von unverändertem Ofloxacin ist die Bedeutung einer eventuellen Biotransformation des restlichen Dosisanteils, quantitativ gesehen, gering. Der einzige beim Menschen gefundene Metabolit ist ein Glukuronid von Ofloxacin, das neben der Muttersubstanz im biliären Sekret gefunden wurde (114). Da einerseits die

Konzentrationen von Ofloxacin mehrfach höher als diejenigen seines Metaboliten waren (114), andererseits eine Gesamtausscheidung über die Galle von 0,5 Prozent der 24-Stunden-Dosis vorlag, sollte die Gesamtbildung der Glukoronidform von Ofloxacin deutlich unter einem Prozent der verabreichten Dosis liegen. Durch seine nahezu vollständige Absorption sowie hohe Stabilität gegen Biotransformation unterscheidet sich Ofloxacin aus pharmakokinetischer Sicht ganz wesentlich von anderen Gyrasehemmern, bei denen bedeutende Anteile der applizierten Dosis als biologisch wenig aktive bzw. inaktive Produkte vorliegen.

Deshalb ist es nicht verwunderlich, daß Ofloxacin bei den umfangreichen Phase II- und Phase III-Studien neben einer ausgezeichneten Wirkung bei Infektionen der Harnwege (Erfolgsrate 92 %) auch auf anderen Gebieten erfolgreich eingesetzt werden konnte. Die Erfolgsquote bei Patienten aus dem Fachgebiet der Inneren Medizin betrug durchschnittlich 81 Prozent, bei Patienten aus den Fachgebieten Chirurgie, Gynäkologie, HNO- und Augenheilkunde 83 - 94 Prozent. Auf dem Gebiet der Dermatologie wurden 108 Patienten mit Ofloxacin behandelt, wobei die Wirksamkeit bei 83 Patienten als gut, bei 20 als nicht ausreichend und bei 5 als unbekannt beurteilt wurde (16). Auch bei Hautinfektionen durch Streptokokken wie dem Erysipel (15) wurden in der Behandlung mit Ofloxacin günstige Ergebnisse erzielt (Klinische Heilungsrate 9/10), wenn auch weithin die neuen Quinolone noch nicht als Indikation für Streptokokkeninfektionen angesehen werden (7). Vor einer breiteren klinischen Prüfung unter diesem Aspekt erscheint es deshalb wissenswert, welche starke bakterizide Effekte die beim Menschen in Serum- und Hautblasenflüssigkeit auf *Streptococcus pyogenes* der Gruppe A nach Lancefield wirkenden Chemotherapeutikumprofile haben, wobei gerade dem Ergebnis der Hautblasenspiegelsimulation unter dem Aspekt der Behandlung von Hautinfektionen besondere Bedeutung zukommt.

Trotzdem darf freilich nicht übersehen werden, daß die Bakterizidieeffekte gegenüber Streptokokken bei der vorliegenden Art experimenteller Situation geringer waren als bei *Staphylococcus aureus*, bei dem sich Ofloxacin im dynamischen Ansatz der In-vitro-Simulation sowohl der Serum- wie auch der Hautblasenflüssigkeitsspiegelprofile als hoch wirksam erwiesen hat, unabhängig von der Penicillinempfindlichkeit des Stammes. Betrachtet man die hier gewonnenen Daten im Zusammenhang, so darf daraus zumindest ein Schluß gezogen werden: Die breite klinische Prüfung von Ofloxacin bei Hautinfektionen durch penicillinresistente bzw. multiresistente Staphylokokken einerseits und durch Streptokokken andererseits, sowie bei Mischinfektionen durch die beiden Spezies, erscheint solange gerechtfertigt, bis hinreichend viele Daten über die klinische Wirksamkeit bei *S.pyogenes* und *S.aureus* vorliegen. Bei der letztgenannten Art wird sich die Aufmerksamkeit auf die Entwicklung einer Resistenz gegen die neuen Quinolone richten, die bislang erst sehr selten beobachtet wurde (56). Dies wird im besonderen Maße für die gerade im dermatologischen Krankengut nicht seltenen Patienten mit β -Lactamantibiotikaallergie interessant sein.

5. Zusammenfassung

Von zwei für den Dermatologen besonders wichtigen Krankheitserregern, *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pyogenes*, wurden an der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München jeweils zwei verschiedene Stämme untersucht. Diese rezenten Hautisolate wurden genau reklassifiziert, ferner wurden MHK-Bestimmungen gegenüber Penicillin G und Ofloxacin durchgeführt.

In den Hauptversuchen wurden die ständig schwankenden Konzentrationen der Serum- und Kantharidinblasenflüssigkeitsspiegel beim Menschen nach einmaliger oraler Gabe von 600 mg Ofloxacin für 8 Stunden in einem Flüssigkeitsmodell simuliert. Dafür wurde mittels peristaltischer Pumpe Bouillon mit konstanter Flußrate aus einem Reservoir R in ein weiteres Gefäß B eingebracht, das eine bestimmte Menge Chemotherapeutikum in einem definierten Volumen der gleichen Bouillon enthielt. Da die Gefäße Teile eines geschlossenen Systems waren, wurde ständig eine entsprechende Menge Flüssigkeit aus dem Gefäß B in ein weiteres Gefäß A befördert. Zu Versuchsbeginn enthielt dieses Gefäß A (es entsprach dem Infektionsort) sich logarithmisch vermehrende Bakterien in einer definierten Größenordnung. Aus dem Gefäß A wurde wiederum ein der eingebrachten Flüssigkeitsmenge entsprechendes Volumen Bouillon nach außen befördert, wo es für Untersuchungen von Keimdichte und tatsächlich erreichter Chemotherapeutikumkonzentration zur Verfügung stand. Jedes einzelne Experiment wurde dreifach ausgeführt, darüber hinaus wurden zur Kontrolle zwei Versuchsansätze ohne Wirkstoff gefahren.

5.1. Erkenntnisse der S.aureus-Testung

Sowohl in Gegenwart des Ofloxacin-Serumspiegelprofils als auch in Gegenwart des entsprechenden Kantharidinblasenflüssigkeitsspiegelprofils kam es bei beiden S.aureus-Stämmen zu einer Reduktion der Keimdichte um etwa 4 - 5 Zehnerpotenzen. Dies fand seinen Niederschlag in einem niedrigen K_n -Wert (maximale Keimreduktion in Prozent), der sich auf 0,007 und 0,0034, bzw. 0,0038 und 0,0047 Prozent belief.

Als besonders stark erwies sich der bakterizide Effekt in den ersten Stunden, also in der Periode der Invasion bzw. der beginnenden Evasion des Chemotherapeutikums: eine Reduktion der Keime um 99 Prozent ($t_{99\%}$ -Wert) beanspruchte in Gegenwart des Serumspiegelprofils nur etwa 1 bis 1,5 Stunden; in Gegenwart des Gewebsspiegelprofils lag dieser Wert bei etwa 1,5 Stunden. Trotzdem wurden im weiteren Versuchsverlauf die Keime nicht vollständig abgetötet. Dies läßt vermuten, daß die trotz entsprechender Annahme auf theoretischer Basis in der klinischen Praxis zumindest bislang nur selten beobachtete Resistenzentwicklung unter Behandlung wohl nur deshalb in der Regel ausbleibt, weil die vorhandene Erregerzahl im Makroorganismus so rasch absinkt.

Insgesamt gingen vom Serumspiegelprofil merklich stärkere bakterizide Effekte aus als vom Gewebsspiegelprofil. Insbesondere in der ersten Stunde nahm die Staphylokokkendichte in Gegenwart des Gewebsspiegelprofils deutlich langsamer ab. Beim Vergleich der beiden unterschiedlichen S.aureus-Hautisolate fiel auf, daß bei dem zufolge der MHK-Bestimmung etwas empfindlicheren Stamm auch die bakteriziden Effekte von Serum- wie Gewebsspiegelprofil etwas stärker ausgeprägt waren.

Generell erwies sich aber nicht nur das beim Menschen nach oraler Gabe von Ofloxacin erreichbare Serumspiegelprofil, sondern auch das entsprechende Gewebsspiegelprofil in vitro

gegenüber *S.aureus* als überaus wirksam. Dabei spielte die Penicillinempfindlichkeit der Erreger, gemessen an der minimalen Hemmkonzentration, keine wesentliche Rolle.

Für die klinische Praxis läßt sich folgender Schluß ziehen: Die orale Anwendung von Ofloxacin bei Staphylokokkenkrankungen dürfte sich als nützlich erweisen, die breite klinische Prüfung bei Hautinfektionen durch penicillinresistente, bzw. multiresistente Staphylokokken erscheint zumindest solange gerechtfertigt, bis hinreichend viele Daten über die Wirksamkeit und ihren Preis in Form von weiterer Resistenzentwicklung vorliegen.

5.2. Erkenntnisse der *S.pyogenes*-Testung

Die beiden unterschiedlichen *S.pyogenes*-Hautisolate zeigten bei der Simulation von Serum- wie Gewebsspiegelprofil trotz der unterschiedlichen Kurvenverläufe keine wesentlichen Unterschiede im bakteriziden Effekt, da in beiden Fällen die ursprüngliche Bakteriendichte deutlich vermindert wurde. Sie sank binnen acht Stunden in jedem Fall um mindestens zwei Zehnerpotenzen, während sie im Kontrollansatz ohne Chemotherapeutikum um knapp zwei Zehnerpotenzen angestiegen war.

Zwischen den beiden Stämmen ergaben sich jedoch erstaunliche Unterschiede, die in den Bakterizidieparametern sichtbar wurden. Während bei dem empfindlicheren Isolat für eine 99%ige Keimreduktion ($t_{99\%}$) in Gegenwart des Serumspiegelprofils 4,0 Stunden und in Gegenwart des Gewebsspiegelprofils 4,7 Stunden nötig waren, dauerte dies beim zweiten Isolat 6,5 bzw. 7,0 Stunden. Diese unterschiedliche Empfindlichkeit schlug sich auch in der maximalen Keimreduktion (in Prozent des Ausgangswertes) nieder: nach acht Stunden erreichte sie beim empfindlicheren Stamm 0,22 für das Serumspiegelprofil und 0,19 Prozent für das Gewebsspiegelprofil, während der zweite Stamm nur 0,65 bzw. 0,61 Prozent erreichte.

Damit reiht sich diese Studie in eine Liste neuerer Untersu-

chungen ein, die für Ofloxacin als einen Vertreter der neueren Generation von Quinolonen eine gute Wirksamkeit auch gegenüber *Streptococcus pyogenes* der Gruppe A nach Lancefield ergibt. Da trotz ermutigender Ergebnisse erster klinischer Prüfungen, auch bei Hauterkrankungen, Ofloxacin weithin noch nicht als Indikation für Streptokokkeninfektionen angesehen wird, so muß man bei Betrachtung der hier gewonnenen Daten im Zusammenhang erkennen, daß eine breitere klinische Prüfung von Ofloxacin bei Streptokokkeninfektionen - speziell der Haut - als gerechtfertigt angesehen werden kann, auch wenn die Bakterizidieffekte gegenüber *Streptococcus pyogenes* bei der vorliegenden Art experimenteller Situation geringer waren als bei *Staphylococcus aureus*.

Verzeichnis der Abbildungen

- Abb. 1: Schematische Grundstruktur der Gyrasehemmer (x = Positionen, die noch weitere Stickstoffatome enthalten können)
- Abb. 2: Strukturformel von Nalidixinsäure
- Abb. 3: Strukturformel von Pipemidinsäure
- Abb. 4: Strukturformel von Flumequine
- Abb. 5: Strukturformel von Norfloxacin
- Abb. 6: Schematische Darstellung einer Plasmid-DNS mit linkshändigem, negativem Supertwist, nach Ausbildung einiger Windungen durch DNS-Gyrase
- Abb. 7: Die Rolle des ATP bei der Gyrasewirkung (Gyrase = DNS-Gyrase), Erläuterungen siehe Text
- Abb. 8: Gram-Präparat der *S.aureus*-Agarkultur, Vergrößerung 800-fach
- Abb. 9: Gram-Präparat der *S.pyogenes*-Agarkultur, Vergrößerung 800-fach
- Abb. 10: Struktur- und Summenformel von Ofloxacin (HOE 280, DL 8280)
- Abb. 11: Ofloxacin-Konzentration (Mittelwert) in Serumflüssigkeit beim Menschen nach einmaliger peroraler Gabe von 600 mg (gestrichelte Linie: Eliminationstangente, siehe 2.6.4)
- Abb. 12: Ofloxacin-Konzentration (Mittelwert) in Kantharidinblasenflüssigkeit beim Menschen nach einmaliger peroraler Gabe von 600 mg
- Abb. 13: Schema des Versuchsaufbaus zur Untersuchung des antimikrobiellen Effekts von ständig schwankenden Ofloxacin-Konzentrationen bei *S.aureus* und *s.pyogenes*
- Abb. 14: Darstellung der Hemmhofdurchmesser von Ofloxacin in Abhängigkeit von der Wirkstoffkonzentration (Standardgerade)
- Abb. 15: Wachstum von *S.aureus*-Hautisolaten im Modellversuch ohne Chemotherapeutikumgabe (durchgezogene Linien: Stamm-Nr. 2057/85, gestrichelte Linien: Stamm-Nr. 1347/85)

- Abb. 16: Wachstum von *S.pyogenes*-Hautisolaten im Modellversuch ohne Chemotherapeutikumgabe (durchgezogene Linien: Stamm Nr.3375/85, gestrichelte Linien: Stamm-Nr.4210/85)
- Abb. 17: Entwicklung der Bakteriendichte (KbE = koloniebildende Einheiten) in Gegenwart des Ofloxacin-Serumspiegelprofils bei *S.aureus*-Stamm-Nr.2057/85 im dreifachen Versuchsansatz (zum Vergleich: die beiden oberen Kurven geben die Entwicklung der Keimdichte in Abwesenheit von Ofloxacin wieder)
- Abb. 18: Tatsächlich erreichte Konzentrations-Zeit-Profile von Ofloxacin im dreifachen Serumspiegel-Simulationsversuch bei *S.aureus*-Stamm-Nr.2057/85 (die gestrichelte Kurve gibt die auf mathematischer Basis aus den klinischen Probandendaten abgeleitete Ideal-kurve wieder)
- Abb. 19: Entwicklung der Bakteriendichte (KbE = koloniebildende Einheiten) in Gegenwart des Ofloxacin-Serumspiegelprofils bei *S.aureus*-Stamm-Nr.1347/85 im dreifachen Versuchsansatz (zum Vergleich: die beiden oberen Kurven gaben die Entwicklung der Keimdichte in Abwesenheit von Ofloxacin wieder)
- Abb. 20: Tatsächlich erreichte Konzentrations-Zeit-Profile von Ofloxacin im dreifachen Serumspiegel-Simulationsversuch bei *S.aureus*-Stamm-Nr.1347/85 (die gestrichelte Kurve gibt die auf mathematischer Basis aus den klinischen Probandendaten abgeleitete Ideal-kurve wieder)
- Abb. 21: Entwicklung der Bakteriendichte (KbE = koloniebildende Einheiten) in Gegenwart des Ofloxacin-Kantharidinblasenflüssigkeits(CBF)-Spiegelprofils bei *S.aureus*-Stamm-Nr.2057/85 im dreifachen Versuchsansatz (zum Vergleich: die beiden oberen Kurven geben die Entwicklung der Keimdichte in Abwesenheit von Ofloxacin wieder)
- Abb. 22: Tatsächlich erreichte Konzentrations-Zeit-Profile von Ofloxacin im dreifachen CBF-Spiegel-Simulationsversuch bei *S.aureus*-Stamm-Nr.2057/85 (die gestrichelte Kurve gibt die auf mathematischer Basis aus den klinischen Probandendaten abgeleitete Idealkurve wieder)

- Abb. 23: Entwicklung der Bakteriendichte (KbE = koloniebildende Einheiten) in Gegenwart des Ofloxacin-Kantharidinblasenflüssigkeits(CBF)-Spiegelprofils bei *S.aureus*-Stamm-Nr.1347/85 im dreifachen Versuchsansatz (zum Vergleich: die beiden oberen Kurven geben die Entwicklung der Keimdichte in Abwesenheit von Ofloxacin wieder)
- Abb. 24: Tatsächlich erreichte Konzentrations-Zeit-Profile von Ofloxacin im dreifachen CBF-Spiegel-Simulationsversuch bei *S.aureus*-Stamm-Nr.1347/85 (die gestrichelte Kurve gibt die auf mathematischer Basis aus den klinischen Probandendaten abgeleitete Idealkurve wieder)
- Abb. 25: Entwicklung der Bakteriendichte (KbE = koloniebildende Einheiten) in Gegenwart des Ofloxacin-Serumspiegelprofils bei *S.pyogenes*-Stamm-Nr.3375/85 im dreifachen Versuchsansatz (zum Vergleich: die beiden oberen Kurven geben die Entwicklung der Keimdichte in Abwesenheit von Ofloxacin wieder)
- Abb. 26: Tatsächlich erreichte Konzentrations-Zeit-Profile von Ofloxacin im dreifachen Serumspiegel-Simulationsversuch bei *S.pyogenes*-Stamm-Nr.3375/85 (die gestrichelte Kurve gibt die auf mathematischer Basis aus den klinischen Probandendaten abgeleitete Idealkurve wieder)
- Abb. 27: Entwicklung der Bakteriendichte (KbE = koloniebildende Einheiten) in Gegenwart des Ofloxacin-Serumspiegelprofils bei *S.pyogenes*-Stamm-Nr.4210/85 im dreifachen Versuchsansatz (zum Vergleich: die beiden oberen Kurven geben die Entwicklung der Keimdichte in Abwesenheit von Ofloxacin wieder)
- Abb. 28: Tatsächlich erreichte Konzentrations-Zeit-Profile von Ofloxacin im dreifachen Serumspiegel-Simulationsversuch bei *S.pyogenes*-Stamm-Nr.4210/85 (die gestrichelte Kurve gibt die auf mathematischer Basis aus den klinischen Probandendaten abgeleitete Idealkurve wieder)
- Abb. 29: Entwicklung der Bakteriendichte (KbE = koloniebildende Einheiten) in Gegenwart des Ofloxacin-Kantharidinblasenflüssigkeits(CBF)-Spiegelprofils bei *S.pyogenes*-Stamm-Nr.3375/85 im dreifachen Versuchsansatz (zum Vergleich: die beiden oberen Kurven geben die Entwicklung der Keimdichte in Abwesenheit von Ofloxacin wieder)

- Abb. 30: Tatsächlich erreichte Konzentrations-Zeit-Profile von Ofloxacin im dreifachen CBF-Spiegel-Simulationsversuch bei *S.pyogenes*-Stamm-Nr.3375/85 (die gestrichelte Kurve gibt die auf mathematischer Basis aus den klinischen Probandendaten abgeleitete Idealkurve wieder)
- Abb. 31: Entwicklung der Bakteriendichte (KbE = koloniebildende Einheiten) in Gegenwart des Ofloxacin-Kantharidinblasenflüssigkeits(CBF)-Spiegelprofils bei *S.pyogenes*-Stamm-Nr.4210/85 im dreifachen Versuchsansatz (zum Vergleich: die beiden oberen Kurven geben die Entwicklung der Keimdichte in Abwesenheit von Ofloxacin wieder)
- Abb. 32: Tatsächlich erreichte Konzentrations-Zeit-Profile von Ofloxacin im dreifachen CBF-Spiegel-Simulationsversuch bei *S.pyogenes*-Stamm-Nr.4210/85 (die gestrichelte Kurve gibt die auf mathematischer Basis aus den klinischen Probandendaten abgeleitete Idealkurve wieder)

Verzeichnis der Tabellen

- Tab. 1: MHK-Werte der *S.aureus*-Hautisolate gegenüber Penicillin G und Ofloxacin
- Tab. 2: MHK-Werte der *S.pyogenes*-Hautisolate gegenüber Penicillin G und Ofloxacin
- Tab. 3: Durchschnittliche Konzentration (mg/l) von Ofloxacin ($\pm$ Standardabweichung) im Blut und im Gewebe
- Tab. 4: Berechnung der Anfangskonzentration $C(0)$ aus den $C(t)$ -Werten der Eliminationsphase beim Serumspiegelprofil
- Tab. 5: Berechnung der Anfangskonzentration $C(0)$ aus den $C(t)$ -Werten der Eliminationsphase beim Kantharidinblasenflüssigkeits(CBF)-Spiegelprofil
- Tab. 6: Versuchsrelevante Pharmakokinetikdaten und daraus abgeleitete experimentelle Größen
- Tab. 7: Berechnung der aufgrund von Probandendaten ermittelten Ofloxacin-Konzentration in Serumflüssigkeit in der Zeit
- Tab. 8: Berechnung der aufgrund von Probandendaten ermittelten Ofloxacin-Konzentration in Kantharidinblasenflüssigkeit in der Zeit
- Tab. 9: Bakterizidieparameter für die in vitro gegenüber dem Konzentrations-Zeit-Profil von Ofloxacin in Serum- und Kantharidinblasenflüssigkeit exponierten *S.aureus*-Hautisolate (Einzeldaten)
- Tab. 10: Bakterizidieparameter für die in vitro gegenüber dem Konzentrations-Zeit-Profil von Ofloxacin in Serum- und Kantharidinblasenflüssigkeit exponierten *S.pyogenes*-Hautisolate (Einzeldaten)

6. Literaturverzeichnis

1. Adhami, Z. N., Wise, R., Weston, D. & Crump, B. (1984)
The pharmacokinetics and tissue penetration of norfloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* 13, 87 - 92
2. Anonymous (1985)
What's to be Done about Resistant Staphylococci? *Lancet* ii, 189 - 190
3. Annear, D. J. & Grubb, W. B. (1973)
Spontaneous loss of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Lancet* i, 110 - 111
4. Ayliffe, G. A. J., Green, W., Livingstone, R., Lowbury, E. J. L. (1977)
Antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in dermatology and burn wards. *J. clin. Path.* 30, 40 - 44
5. Bailey, J. M. G., Hepplestone, G. & Richmond, S. J. (1984)
Comparison of the In vitro Activities of Ofloxacin and Tetracycline against *Chlamydia trachomatis* as Assessed by Indirect Immunofluorescence. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 26, 13 - 16
6. Barber, M., Csillage, A. & Medway, A. J. (1958)
Staphylococcal infection resistant to chloramphenicol, erythromycin and novobiocin. *Brit. Med. J.* 2, 1377 - 1380
7. Bauernfeind, A., Petermülller, C. (1984)
Vergleich der antibakteriellen Profile von Ciprofloxacin, Norfloxacin, Pefloxacin, Ofloxacin, Enoxacin, Pipemidinsäure und Nalidixinsäure. In *Fortschr. antimikrob. antineoplast. Chemother./Gyrasehemmer I*, Bd.-Hrsg.: W. Stille, D. Adam, H.-U. Eickenberg, H. Knothe, G. Ruckdeschel, C. Simon; Futuramed, München, 1984, 531 - 548
8. Bauernfeind, A., Petermüller, C., Heinrich, B. & Gablac, R. (1986)
Abhängigkeit von Bakerizidie und Mutantenselektion bei 4-Chinolonen von deren Serumkonzentrationsverläufen. *Infection* 14, Suppl. 1, 26 - 30
9. Bauernfeind, A., Sauerwein, D., Danninger, J., Keding, M. (1984)
Reduktion der Empfindlichkeit von *Pseudomonas aeruginosa* gegenüber neuen 4-Quinolonen durch Mutation in vitro und in vivo. In *Fortschr. antimikrob. antineoplast. Chemother. / Gyrasehemmer I*, Bd.-Hrsg.: W. Stille, D. Adam,

- H.-U. Eickenberg, H. Knothe, G. Ruckdeschel, C. Simon;
Futuramed, München, 1984, 521 - 529
10. Bauernfeind, A. & Ullmann, U. (1984)
In-vitro activity of enoxacin, ofloxacin, norfloxacin and nalidixic acid. *J. Antimicrob. Chemother.* 14, Suppl. C, 33 - 37
 11. Benner, E. J. & Kayser, F. H. (1968)
Growing clinical significance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Lancet* ii, 741 - 744
 12. Bergan, T., Carlsen, J. B. & Fuglesang, J. E. (1980)
An in vitro model for monitoring bacterial responses to antibiotic agents under simulated in vivo conditions. *Infection* 8, Suppl. 1, 96 - 102
 13. Bint, A. J., George, R. H., Healing, D. E., Wise, R. & Davies, M. (1977)
An outbreak of infection caused by a gentamicin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. clin. Path.* 30, 165 - 167
 14. Black, P. H., Swartz, M. N., Sharp, J. T., Kunz, L. J., Stokes III, J. & McFarland, R. B. (1961)
Severe Streptococcal Disease. *N. Engl. J. Med.* 264, 898-903
 15. Blomer, R., Bruch, K., Zahlten, R. N. (1986)
Zusammengefaßte Ergebnisse der klinischen Phase II- und III-Studien mit Ofloxacin (HOE 280) in Europa. *Infection* 14, Suppl. 1, 102 - 107
 16. Bruch, K. (1984)
Klinischer Ergebnisse mit Ofloxacin. In *Fortschr. antimikrob. antineoplast. Chemother.* / Gyrase-Hemmer I, Bd-Hrsg.: W. Stille, D. Adam, H.-U. Eickenberg, H. Knothe, G. Ruckdeschel, C. Simon; Futuramed, München, 1984, 741-748
 17. Brun, Y., Fleurette, J. & Forey, F. (1978)
Micromethod for biochemical identification of coagulase-negative *Staphylococci*. *J. clin. Microbiol.* 8, 503 - 508
 18. Bulger, R. J., Sherris, J. C. (1968)
Decreased incidence of antibiotic resistance among *Staphylococcus aureus*: a study in a university hospital over a 9-year period. *Ann. Intern. Med.* 69, 1099 - 1108
 19. Burneff, J. W. (1963)
The Route of Antibiotic Administration in Superficial Impetigo. *N. Engl. J. Med.* 268, 72 - 75

20. Caesar, M., Stille, W. (1984)
Die Chemotherapeutika der Nalidixidinsäure-gruppe: Eine Dokumentation. Zuckschwerdt Verlag, München-Bern-Wien, 1984.
21. Chantot, J. F., Bryskier, A. (1985)
Antibacterial activity of ofloxacin and other 4-quinolone derivatives: in-vitro and in-vivo comparison. J. Antimicrob. Chemother. 16, 475 - 484
22. Cho, N., Fukunaga, K., Kunii, K., Komoriyama, Y (1983)
Laboratory and Clinical Studies on DL-8280. Antimicrobial Activity, Pharmacokinetics and Clinical Utility in the Obstetrical and Gynecological Field.
Proceedings of the 13th International Congress of Chemotherapy, Vienna: SP 4.6/5 - 15
23. Crump, B., Wise, R. & Dent, J. (1983)
Pharmacokinetics and tissue penetration of ciprofloxacin. Antimicrob. Ag. Chemother. 24, 784 - 786
24. Cullmann, W., Karch, H., Stieglitz, M., Baars, B., Opferkuch, W. (1984)
Vergleich der antibakteriellen Aktivität verschiedener Gyrase-Hemmer gegenüber grampositiven und gramnegativen Keimen. In Fortsch. antimikrob. antineoplast. Chemother. / Gyrase-Hemmer I, Bd.-Hrsg.: W. Stille, D. Adam, H.-U. Eickenberg, H. Knothe, G. Ruckdeschel, C. Simon: Futuramed, München, 1984, 571 - 578
25. Dagrosa, E., Seeger, K., Malerczyk, V., Lameire, N. (1984)
Pharmakokinetik von Ofloxacin (HOE 280), In Fortsch. antimikrob. antineoplast. Chemother. / Gyrase-Hemmer I, Bd.-Hrsg.: W. Stille, D. Adam, H.-U. Eichenberg, H. Knothe, G. Ruckdeschel, C. Simon: Futuramed, München, 1984, 665- 671
26. Dekio, S. & Onimura, K. (1982)
Correlations between Coagulase Types and Antibigrams of Staphylococcus aureus from bacterial skin infections. J. Dermatol. 9, 413 - 419
27. Dekio, S., Hirata, T., Jidoi, J., Ozasa, S. Ohno, H. (1985)
Antibiotic susceptibilities of Staphylococcus aureus Strains Devired From Furuncle And Bullous Impetigo. J. Dermatol. 12, 47 - 51
28. Denhardt, D. T. (1979)
DNA gyrase and DNA unwinding. Nature 280, 196 - 201

29. Derrick, L. W. & Dillon, H. C. (1970)
Further studies on treatment of streptococcal skin infections. *J. Pediat.* 77, 696 - 701
30. Dickgießer, N. (1984)
Wirkungsweise und Resistenzmechanismen der Gyrasehemmer. *Immun. Infekt.* 12, 298 - 302
31. Digranes, A., Dibb, W. L., Benonisen, E. (1985)
In vitro Activities of Ciprofloxacin, Ofloxacin, Norfloxacin and Rosoxacin Compared with Cinoxacin and Trimethoprim. *Chemotherapy* 31, 466 - 471
32. Dillon, H. C. (1970)
The treatment of streptococcal skin infections. *J. Pediat.* 76, 676 - 684
33. Dillon, H. C., Derrick, L. W. (1975)
Clinical experience with clindamycin hydrochloride. 1. Treatment of streptococcal and mixed streptococcal-staphylococcal skin infections. *Pediatrics* 55, 205 - 212
34. Duckworth, G. J., Williams, J. D. (1984)
Frequency of appearance of resistant variants to norfloxacin and nalidixic acid. *J. Antimicrob. Chemother.* 13, Suppl. B, 33 - 38
35. Duma, R. J., Weinberg, A. N. Medrek, T. F & Kunz, L. J. (1969)
Streptococcal Infections. *Medicine* 48, 87 - 126
36. Feingold, D. S., Stagg, N. L., Kunz, L. J. (1966)
Streptococcal infections: importance of the various serologic groups. *N. Engl. J. Med.* 275, 356 - 361
37. Feller, A. E., Stevens, D. A. (1964)
Sheep blood agar for the isolation of Lancefield groups of beta-haemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* 119, 761-780
38. Fisher, L. M. (1981)
DNA supercoiling by DNA-gyrase. *nature* 294, 607 - 610
39. Fisher, L. M. (1984)
DNS supercoiling and gene expression. *Nature* 307, 686-689
40. Gerber, A. U., Wiprächtiger, P., Stettler-Spichiger, U. & Lebek, G. (1982)
Constant infusions vs. intermittent dosis of gentamicin

- against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *J. Infect. Diseases* 145, 554 - 560
41. Gladtko, E. & von Hattingberg, H. M. (1979)
Pharmacokinetics - An Introduction. Springer, Berlin, 1979, 58 - 59
 42. Goosens, H., de Mol, P., Coignan, H., Levy, J., Grados, O., Ghysels, G., Innocent, H. & Butzler, J. P. (1985)
Comparative In Vitro Activities of Aztreonam, Ciprofloxacin, Norfloxacin, Ofloxacin, HR 810 (a New Cephalosporin), RU 28965 (a New Macrolide) and Other Agents Against Enteropathogens. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 27, 388 - 392
 43. Goto, S., Fujimoto, T., Tsuji, A. (1983)
In vitro and in vivo activity of DL-8280, a new pyridone carboxylic acid derivative. *Proceedings of the 13th International Congress of Chemotherapy. Vienna, SP-4.6./5-5*
 44. Grasso, S., Meinardi, G., de Carneri, J. & Tamassia, V. (1978)
New In vitro Model to Study the Effect of Antibiotic Concentration and Rate of Elimination on Antibacterial Activity. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 13, 570 - 576
 45. Grasso, S. (1985)
Historical review of in-vitro models. *J. Antimicrob. Chemother.* 15, Suppl. A, 99 - 102
 46. Greenblatt, D. J., Koch-Weser, J. (1975)
Clinical Pharmacokinetics. N. Engl. J. Med. 297, 702-705
 47. Greenwood, D. & O'Grady, F. (1978)
An in vitro model of the urinary bladder. *J. Antimicrob. Chemother.* 4, 113 - 120
 48. Greer, J. E., Menard, R. R., Livingood, C. S. (1962)
Some Bacteriological Data on Dermatological Patients. *J. Invest. Derm.* 36, 273 - 282
 49. Gregorczyk, K. (1961)
Zur Chemo- und antibiotischen therapie bei pyogenen Hautkrankheiten. *Derm. Wschr.* 144, 853 - 855
 50. Hattingberg, von, H. M., Brockmeier, d., Kreuter, G. (1977)
A rotating iterative procedere (RIP) for estimating hybrid constants in multicompartment analysis on desk computers. *Eur. J. Clin. Pharmacol* 11, 381 - 388

51. Hauser, C., Wuethrich, B., Matter, L., Wilhelm, A., Sonnabend, W., Schopfer, K. (1985)
Staphylococcus aureus Skin Clonization in Atopic Dermatitis Patients. *Dermatologica* 170, 35 - 39
52. Hauser, C., Wuethrich, B., Matter, L., Wilhelm, A., Schopfer, K. (1985)
Immune Response to Staphylococcus aureus in Atopic Dermatitis. *Dermatologica* 170, 114 - 120
53. Higashi, F., Funatsu, Y. (1983)
Clinical Study of Effect of D:-8280, A New Synthetic Oxacine Derivative. *Proceedings of the 13th International Congress of Chemotherapy, Vienna, SP4.6/5-21*
54. Holmes, B., Brodgen, R. N., Richards, D. M. (1985)
Norfloxacin. A Review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and its therapeutic use. *Drugs* 30, 482 - 513
55. Hughes, W. T., Wan, R. T. (1967)
Impetigo Contagiosa, Etiology, Complications and Comparison of Therapeutic Effectiveness of Erythromycin and Antibiotic Ointment. *Amer. J. Dis. Child.* 113, 449 - 453
56. Humphreys, H., Mulvihill, E. (1985)
Ciprofloxacin-Resistant Staphylococcus aureus. *Lancet* ii, 383
57. Jenny, D. (1967)
Bakterienflora der Haut und ihre Resistenzverhältnisse. *Dermatologica* 134, 293 - 300
58. King, A., Shannon, K., Philipps, J. (1984)
The in-vitro activity of ciprofloxacin compared with that of norfloxacin and nalidixic acid. *J. Antimicrob. Chemother.* 13, 325 - 331
59. Klaus, U., Henninger, W., Jakobi, P. & Wiedemann, B. (1981)
Bacterial Elimination and Therapeutic Effectiveness under Different Schedules of Amoxicillin Administration. *Chemotherapy* 27, 200 - 208
60. Kloss, W. E., Schleifer, K. H. (1975)
Simplified Scheme for routine identification of human Staphylococcus species. *J. Clin. Microbiol.* 1, 82 - 88
61. Kobayashi, H., Takamura, K. (1983)
Clinical Effects of DL-8280, A New Synthetic Antimicrobial Agent on The Lower Respiratory Tract Infection,

Proceeding of the 13th International Congress of Chemotherapy, Vienna, SP 4.6./5 - 11

62. Kono, M., Sasatsu, M., O'ttara, K., Shiomi, Y. & Hayasaka, T. (1983)
Mechanism of Resistance to Some Cephalosporins in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 23, 938-940

63. Korting, H. C., Niederauer, H., Ollert, M. (1986)
Bactericidal Activity of Cefotiam and Ceftizoxime against *Neisseria gonorrhoeae* in an in vitro Model Simulating Plasma and Cantharidal Blister Fluid Levels after the Single Intramuscular Application of One Gram. *Chemotherapy* 32, 260 - 269

64. Korting, H. C., Ollert, M., Lukacs, A., Schäfer-Korting, M. (1986)
Can the clinical efficacy of different antibiotic dosage regimens in gonorrhoea be predicted from the gonocidal effect of the corresponding plasma level profiles simulated in vitro? *Acta dermato-venereol.* in press

65. Korting, H. C., Schlaf-Maier, U., Schäfer-Korting, M. (1986)
Antimikrobielle Effekte des in vitro simulierten Ketconazol-Kantharidinblasenflüssigkeitsspiegel-Profils bei *Candida albicans*. *Mykosen* 29, 297 - 305

66. Kumada, T., Neu, H. C. (1983)
DL 8280, A Quinolone Antibacterial Agent with Broad-Spectrum Activity. *Proceedings of the 13th International Congress of Chemotherapy, Vienna, SP 4.6/5-1*

67. Lacey, R. W. (1975)
Antibiotic Resistance Plasmids of *Staphylococcus aureus* and Their Clinical Importance. *Bacteriolog. Rev.* 39, 1-32

68. Lancefield, R. C. (1933)
A serological differentiation of human and other groups of haemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* 57, 571 - 595

69. Lancefield, R. C. (1962)
Current Knowledge of type-specific M antigens of group A streptococci. *J. Immunol.* 89, 307 - 313

70. Lange, H., Paetzold, Oh. H., Grauer, E. K. (1977)
Antibiotikaresistenz von Staphylokokken bei Hauterkrankungen. *Hautarzt* 28, 314 - 318

71. Loewe, H. (1984)
Chemie der Gyrasehemmer. Fortschr. antimikrob. antineoplast. Chemother. / Gyrase-Hemmer I, Bd.-Hrsg: W. Stille, D. Adam, H.-K. Eickenberg, H. Knothe, G. Ruckdeschel, C. Simon; Futuramed, München, 1984, 485 - 491
72. Marples, R. R. & Richardson, J. P. (1982)
Evaluation of a micromethod gallery (API Staph) for the identification of staphylococci and micrococci. J. Clin. Path. 35. 650 - 656
73. McCormack, R. C., Kaye, D., Hook, E.W. (1962)
Resistance of Group A Streptococci To Tetracycline. N. Eng. J. Med. 267, 323 - 326
74. McDonald, S. (1966)
Transduction of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. Lancet ii, 1107 - 1110
75. Meyer-Rohn, J. (1962)
Keimresistenz gegen Antibiotika, ihre Analyse und Bedeutung für die Klinik. Ther. Gegenw. 101, 391 - 399
76. Meyer-Rohn, J. (1962)
Antibiotikaresistenz von Bakterien, ihre Analyse und Ausweichmöglichkeiten in der Therapie durch neuere Antibiotika. Z. Haut-Geschl.Kr.. 33, 260 - 270
77. Michel, B., Le Noc, P. (1979)
Choix d'une méthode sérologique ou biochimique pour le diagnostic du groupe des Streptocoques en pratique courante. Ann. Biol. Clin. 130 A, 6 - 7
78. Montay, G., Goueffon, Y., Roquet, F. (1984)
Absorption, distribution, metabolic fate, and elimination of pefloxacin mesylate in mice, rats, dogs, monkeys and humans. Antimicrob. Ag. Chemother. 25, 463 - 472
79. Murakawa, T., Sakamoto, A., Hirose, T. & Nishida, M. (1980)
New in vitro kinetic model for evaluating bactericidal efficacy of antibiotics. Antimicrob. Ag. Chemother. 18, 377 - 381
80. Naidoo, J. & Noble, W. C. (1978)
Acquisition of antibiotic resistance by Staphylococcus aureus in skin patients. J. Clin. Path. 31, 1187 - 1192
81. Niki, Y., Soejima, R., Matsushima, T., Kawanishi, M., Nakakama, C. & Watanabe, M. (1983)
Clinical Studies on DL-8280 in The Treatment of Patients

with Respiratory Tract Infections. Proceedings of the 13th International Congress of Chemotherapy, Vienna, SP 4.6/5-10

82. Nishida, M., Murakawa, T., Kamimura, T., Okada, N., Sakamoto, H., Fukada, S., Nakamodo, S., Yokota, Y. & Miki, K. (1976)
Laboratory evaluation of FR 10612, a new oral cephalosporin derivative. *J. Antibiot.* 29, 444 - 459
83. Noble, W. C. & White, P. M. (1972)
Isolation for the control of infections in skin wards. *J. Hyg. (Cambridge)* 70, 545 - 549
84. Noble, W. C., Naidoo, J. (1978)
Evolution of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*: The role of the skin. *Brit. J. Dermatol.* 98, 481 - 489
85. O'Grady, F. & Pennington, J. H. (1966)
Bacterial growth in an in vitro system simulating conditions in the urinary bladder. *Brit. J. Exp. Path.* 47, 152 - 157
86. Osada, Y., Tsumura, M., Tachizawa, H., Uno, T. & Sauro, M. (1981)
DL-8280, a novel oral antimicrobial agent: absorption and excretion in animals and humans. 21st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, 4 - 6th Nov. 1981, Abst. No. 562.
87. Osada, Y., Ogawa, H. (1983)
Antimycoplasmal Activity of Ofloxacin (DL-8280). *Antimicrob. Ag. Chemother.* 23, 509 - 511
88. Otake, H., Ozawa, A. & Goto, J. (1976)
Mode of action of chemotherapeutic agents against bacteria growing in a continuous flow culture with special reference to the antibacterial effect of cephalothin, erythromycin and kanamycin. In *Chemotherapy*, Plenum Press, New York, 205 - 210
89. Paetzold, O. H. (1985)
Zur Antibiotika-Resistenz der Staphylokokken in der Dermatologie. *Dt. Derm.* 33, Heft 11, 1213 - 1218
90. Paetzold, O. H. (1965)
Über halbsynthetische Penicilline in der Dermatologie. *Z. Haut-Geschl.Kr.* 39, 192 - 199
91. Peeters, M., Van Dyck, E. Piot, P. (1984)
In vitro Activities of the Spectinomycin Analog U-6366

- and Four Quinolone Derivatives against *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 26, 608 - 609
92. Peter, G. & Smith, Al L. (1977)
Group A streptococcal Infections of the Skin and Pharynx.
N. Engl. J. Med. 297, 311 - 317
 93. Pulverer, G. (1972)
Zur derzeitigen medizinischen Bedeutung und Antibiotika-resistenz von Staphylokokken. *Dtsch. med. Wschr.* 97, 252 - 254
 94. Pulver, G., Damen, G. (1972)
Aktuelle Resistenzsituation von *Staphylococcus aureus*.
Med. Klin. 67, 608 - 614
 95. Radebold, K. Essers, L. (1980)
Zur Beurteilung des API-Staph-Systems für die routinemäßige Identifizierung von Staphylokokken. *Ärztl. Lab.* 26, 236 - 238
 96. Robertson, M. H. (1965)
Beta-haemolytic Streptococci in South-west Essex, with Particular Reference to Tetracycline Resistance. *Brit. Med. J.* 2, 569 - 571
 97. Rowe, W. L. & Morozowich, W. (1969)
A simple dilution analog computer for simulation of drug distribution processes. *J. Pharm. Sci.* 58, 1375 - 1378
 98. Saito, A., Tomizawa, M. (1983)
Blood levels and urinary excretion of DL-8280 in human. Proceedings of the 13th International Congress of Chemotherapy, Vienna, SP 4.6/5-4
 99. Saito, A., Matsumoto, F., Yamaji, T., Shiba, K. (1983)
Clinical studies on DL-8280 in the field of internal medicine. Proceedings of the 13th International Congress of Chemotherapy. Vienna, SP 4.6/5-14
 100. Sakai, K., Fujimoto, M., Ueda, T. (1983)
Results of Clinical Use of DL-8280 in Surgical Field. Proceedings of the 13th International Congress of Chemotherapy, Vienna, SP 4.6/5-18
 101. Sambe, B., Ueda, R., Kobayashi, K., Okada, J., Inafuku, M. (1983)
Fundamental and Clinical Studies of DL-8280 in Otorhinolaryngological Infections. Proceedings of the 13th International Congress of Chemotherapy, Vienna, SP 4.6/5-22

102. Sanfilippo, A. & Morvillo, e. (1968)
An experimental model for the study of the antibacterial activity of the Sulfonamides. *Chemotherapy* 13, 54 - 60
103. Sato, K., Inoue, M., Mitsuhashi, S. (1983)
In Vitro and In Vivo Antibacterial Activity of a New Pyridonecarboxylic acid, DL-8280. *Proceedings of the 13th International Congress of Chemotherapy, Vienna, SP 4.6/5-2*
104. Seeger, K. (1984)
Ergebnisse präklinischer Untersuchungen von Ofloxacin. *Fortschr. antimikrob. antineoplast. Chemother. / Gyrase-Hemmer I, Bd.-Hrsg.: W. Stille, D. Adam, H.-U. Eickenberg, H. Knothe, G. Ruckdeschel, C. Simon; Futuramed, München, 1984, 621 - 628*
105. Seibert, G., Limbert, M., Klesel, N. (1983)
Comparison of the Antibacterial in Vitro and in Vivo Activity of Ofloxacin (HOE 280, DL 8280) and Nalidixic Acid Analogues. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 2, 548 - 553
106. Shah, P. M., Hübner, K. G. & Stille, W. (1978)
In-vitro Untersuchungen zur intermittierenden Therapie mit Penicillin G und Ampicillin. *Medizinische Welt* 29, 888 - 892
107. Shah, P. M. & Bender, H. (1978)
Bacterial activity of cefoxitin and cefuroxin. *J. Antimicrob. Chemoth.* 4, 163 - 168
108. Shah, P. M. (1980)
An improved method to study antibacterial activity of antibiotics in an in vitro model simulating serum levels. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmac.* 4, 171 - 176
109. Shah, P. M. (1983)
Bactericidal activity of ampicillin and amoxicillin. *J. Antimicrob. Chemother.* 11, Suppl. A, 73 - 78
110. Shishido, H., Matsumoto, K., Takahashi, A., Harada, T., Watanabe, K., Kaida, S. (1983)
Clinical and Laboratory Evaluation of DL-8280, a New Oxazine Derivative, for the Treatment of Respiratory Infections *Proceedings of the 13th International Congress of Chemotherapy, Vienna, SP 4.6/5-13*
111. Stiile, W., Simon, C. (1982)
Antibiotika-Therapie in Klinik und Praxis. F. K. Schattauer Verlag. 5. Aufl., Stuttgart - New York, 24 - 34
112. Suzuki, K., Nagakubo, J., Bandoh, T., Aoki, S., Naide, Y.

(1983)

Clinical Evaluation of DL-8280 in Bacterial Prostatitis. Proceedings of the 13th International Congress of Chemotherapy. Vienna, SP 4.6/5-9

113. Suzuyama, Y., Shigno, Y., Yamaguchi, K., Saito, A., Hara, K. (1983)
Laboratory and clinical studies on DL-8280 in Respiratory Tract Infections. Proceedings of the 13th International Congress of Chemotherapy. Vienna, SP 4.6/5-20
114. Tanimura, H., Kobayashi, N., Saito, T., Sato, T., Takahashi, T., Huang, W. F., Hikasa, Y. (1983)
Excretion into bile, tissue level of gallbladder and clinical effects of DL-8280 for biliary tract infections. Proceedings of the 13th International Congress of Chemotherapy, Vienna, SP 4.6/5-6
115. Vogel, L., Nathan, C., Sweeney, H. M., Kabins, S. A., Cohen, S. (1978)
Infections Due to Gentamicin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a Nursery for Neonatal Infants. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 13, 466 - 472
116. Waitkins, S. A., Anderson, D. R., Todd, F. K. (1981)
An evaluation of the API STREP identification system. *Med. Lab. Sci.* 38, 35 - 39
117. Weirich, E. G. (1959)
Die therapieresistenten Pyodermien. *Pathologisch-mikrobiologische Grundlagen und Ergebnisse mehrjähriger klinischer Untersuchungen.* *Z. Haut-Geschl.Kr.* 26, 77 - 87
118. Wiedemann, B., Kresken, M. (1984)
The Incidence and Development of Resistance in *Staphylococcus aureus* from three European Countries. *J. Antimicrob. Chemother.* 14, Suppl. D, 27 - 34
119. Wiedemann, B., Seeberg, A. H. (1984)
The Activity of Cefotiam on β -lactamase-producing Bacteria in an in vitro model. *J. Antimicrob. Chemother.* 13, 111 - 119
120. Williams, R. F. (1982)
Choice of Chemotherapy for infection by *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 9, 1 - 5
121. Wilson, P. E., White, P. M. & Noble, W. C. (1971)
Infections in a Hospital for Patients with Diseases of the skin. *J. Hyg.* 69, 125 - 132
122. Wise, R., Gillet, A. P., Cadge, B., Durham, S. R. &

- Baker, S. (1980)
The influence of protein binding upon tissue fluid level of β -lactam antibiotics. *J. Infect. Diseases* 142, 77 - 82
123. Wise, R., Lockley, M. R. / Dent, J. (1984)
The Pharmacokinetics and Tissue penetration of Ofloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* 14, 647 - 652
124. Wise, R., Lockley, M. R., Webberly, M. & Adhami, Z. N. (1984)
The Pharmacokinetics and Tissue penetration of enoxacin and norfloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* 14, Suppl. C, 75 - 81
125. Wyatt, T. D., Ferguson, W. P., Wilson, T. S. & McCormick, E. (1977)
Gentamicin Resistant *Staphylococcus aureus* Associated with the Use of Topical Gentamicin. *J. Antimicrob. Chemother.* 3, 213 - 217
126. Yura, J., Shibata, K., Shinagawa, N., Ishikawa, S. & Hayashi, U. (1983)
Fundamental and Clinical Studies of DL-8280 in the Surgical Field. *Proceedings of the 13th International Congress of Chemotherapy, Vienna, SP 4.6/5-17*
127. Zeiler, H. J., Grohe, K. (1984)
The In Vitro and In Vivo Activity of Ciprofloxacin. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 3, 339 - 343
128. Zierz, P., Paetzold, O. H., Sinai, B. (1961)
Zur Frage der Staphylokokken-Hospitalismus im Bereich der Dermatologie. *Hautarzt* 12, 365 - 36

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. O. Braun-Falco danke ich für die Überlassung des vorliegenden Themas und für die Möglichkeit, die damit verbundenen Untersuchungen an der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität, München, durchführen zu können.

Herrn OA Priv.Do. Dr. H.C. Korting gilt mein besonderer Dank für seine wertvolle Anleitung und die wohlwollende Unterstützung bei der Bearbeitung der gestellten Aufgabe.

Des weiteren möchte ich Frau Dr. Schäfer-Korting vom Pharmakologischen Institut für Naturwissenschaftler der Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt, für die eingehende Diskussion pharmakokinetischer Aspekte danken.

Herzlich danke ich schließlich den medizinisch-technischen Assistentinnen des Bakteriologischen Labors für ihre Beratung in technischen Fragen und ihre stete Hilfsbereitschaft.

8. Lebenslauf

Am 6. September 1954 wurde ich, Wilhelm Maier, als Sohn des Kriminalbeamten Josef Maier und seiner Ehefrau Gottfriede Maier, geb. Müller, in Tegernsee geboren.

Von Sept. 1960 bis Juli 1965 besuchte ich die Volksschule in Gmund, im Sept. 1965 trat ich auf das math.-nat. Gymnasium in Tegernsee über, wo ich im Juni 1974 die Reifeprüfung ablegte. Von Juli 1974 bis Juni 1976 leistete ich meinen Grundwehrdienst als Soldat auf Zeit ab.

Von April 1977 an war ich im Praxislabor Dr. Mühlbauer, Murnau, als angelernter Zahntechniker beschäftigt, das ich im Juli 1978 verließ, um im Dental-Labor Meyer, Murnau, eine Lehre als Zahntechniker zu beginnen, die ich im Febr. 1981 mit der Gesellenprüfung beendete.

Ab dem Sommersemester 1981 studierte ich Zahnheilkunde an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Im April 1982 bestand ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung, im Okt. 1983 die zahnärztliche Vorprüfung.

Im Jan. 1985 begann ich die meiner Promotionsarbeit zu Grunde liegenden Untersuchungen an der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München.

Am 14.9.1985 habe ich mit Frau Ulrike Schlaf die Ehe geschlossen.

Unser erstes Kind Moritz Sebastian wurde am 20.2.1986 geboren.

Im Juli 1986 beendete ich nach 10 Semestern mein Studium der Zahnheilkunde mit dem Staatsexamen und erhielt im Aug. 1986 die Approbation als Zahnarzt.

